

# THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Sciences

École doctorale GAIA

Unité de recherche LSTM

## Principe de facilitation appliqué à la restauration écologique de sites miniers dégradés Suivi des communautés ectomycorhiziennes au cours de successions végétales assistée par *Acacia spirorbis*

Présentée par Anne HOULES

Le 24 Novembre 2017

Sous la direction de Marc DUCOUSSO  
et Philippe JOURAND

Devant le jury composé de

Pierre Emmanuel COURTY, Chargé de recherche INRA Dijon (HDR)

Mélanie ROY, Maître de conférences, Université Paul Sabatier Toulouse (HDR)

Claude PLASSARD, Directrice de Recherche, INRA Montpellier (Représentante ED Gaia)

Hamid AMIR, Professeur de l'Université de Nouvelle-Calédonie

Robin DUPONNOIS, Directeur de Recherche, IRD Montpellier (Représentant de l'UMR LSTM)

Marc DUCOUSSO, Chercheur CIRAD, UMR LSTM (HDR)

David HAVET, Ingénieur Koniambo Nickel SAS, Responsable Service Environnement

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Directeur de la thèse

Invité du jury



UNIVERSITÉ  
DE MONTPELLIER





Biodiversité  
Agriculture  
Alimentation  
Environnement  
Terre  
Eau



## THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Sciences

École doctorale GAIA

Unité de recherche LSTM

### Principe de facilitation appliqué à la restauration écologique de sites miniers dégradés Suivi des communautés ectomycorhiziennes au cours de successions végétales assistée par *Acacia spirorbis*

Présentée par Anne HOULES

Le 24 Novembre 2017

Sous la direction de Marc DUCOUSSO

Devant le jury composé de

Pierre Emmanuel COURTY, Chargé de recherche INRA Dijon (HDR)

Mélanie ROY, Maître de conférences, Université Paul Sabatier Toulouse (HDR)

Claude PLASSARD, Directrice de Recherche, INRA Montpellier (Représentante ED Gaia)

Hamid AMIR, Professeur de l'Université de Nouvelle-Calédonie

Robin DUPONNOIS, Directeur de Recherche, IRD Montpellier (Représentant de l'UMR LSTM)

Marc DUCOUSSO, Chercheur CIRAD, UMR LSTM (HDR)

David HAVET, Ingénieur Koniambo Nickel SAS, Responsable Service Environnement

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Directeur de la thèse

Invité du jury



UNIVERSITÉ  
DE MONTPELLIER



‘He grew low palms, for their spreading leaves shaded his plants from the sun which otherwise might in that stark valley wither them.’

T. E. Lawrence

« En comprenant mieux le sol, nous trouvons qu’il est non seulement plus complexe que l’on imagine, mais aussi qu’il est plus complexe et merveilleux que l’on peut imaginer »

Prof. W.R Gardner, 1991



## Résumé

*Acacia spirorbis* est une espèce endémique de la Nouvelle-Calédonie, capable de former des symbioses avec des microorganismes du sol, notamment des ectomycorhizes et de se développer sur une très large variété de sols. Afin de tester les capacités de cette espèce à permettre d'initier un processus de restauration écologique des écosystèmes dégradés par l'exploitation minière, un essai en pépinière et trois essais sur le terrain ont été mis en place. Ces essais ont permis de mettre en évidence la capacité d'*A. spirorbis* à jouer, grâce à la facilitation, un rôle de plante nurse pour des espèces cibles de la restauration écologique comme des espèces du genre *Tristaniopsis*. Ainsi, nous avons tout d'abord décrit la diversité des champignons ectomycorhiziens associés avec *A. spirorbis* puis, nous avons constatés leur capacité à s'associer sur le terrain aux *Tristaniopsis* grâce à la présence initiale d'*A. spirorbis*. Les capacités d'*A. spirorbis* à faciliter l'implantation d'autres espèces en améliorant leur survie, leur croissance et en leur permettant de disposer de partenaires fongiques ectomycorhiziens diversifiés sont décrites. Ces résultats ont conduit à proposer un itinéraire technique de restauration écologique des maquis miniers dégradés, itinéraire fondés sur la facilitation entre espèce utilisant *A. spirorbis* comme plante nurse.

**Mots clefs:** Maquis minier, Restauration écologique, *Acacia spirorbis*, Plante nurse, Nouvelle-Calédonie, ectomycorrhize

## Abstract

*Acacia spirorbis* is an endemic species of New Caledonia, capable of forming symbiosis with soil microorganisms, including ectomycorrhizae and developing on a very wide variety of soils. In order to test the capacities of this species to initiate a process of ecological restoration of ecosystems degraded by mining activities, a nursery trial and three field trials were set up. These trials highlight the ability of *A. spirorbis* to play, through facilitation, a nurse plant role for target species of the genus *Tristaniopsis* in the frame of ecological restoration processes. Thus, we first described the diversity of the ectomycorrhizal fungi associated with *A. spirorbis* and then we described their ability to associate in the field with *Tristaniopsis* thanks to the initial presence of *A. spirorbis*. The capacities of *A. spirorbis* to facilitate the implantation of other target species by improving their survival, growth and allowing them to access to a diversified range of ectomycorrhizal fungal partners are described. These results led to propose a technical itinerary for ecological restoration of degraded mining maquis, an itinerary based on facilitation between species using *A. spirorbis* as a nurse plant.

**Keywords:** Maquis minier, Ecological Restoration, *Acacia spirorbis*, Nurse plant, New Caledonia





## Remerciements

Je voudrais commencer par remercier les membres du jury ; Pierre Emmanuel Courty avec qui j'ai eu l'honneur d'échanger au congrès international de la biologie des sols à Prague en 2016, Emilie Roy qui a pris le temps d'examiner en détail mon travail, Claude Plassard qui a suivi ma thèse depuis le début, pour me conseiller, m'aiguiller et m'écouter, Professeur Hamid Amir avec qui j'ai eu le plaisir de travailler en Nouvelle-Calédonie dans le cadre de l'ANR ADASPIR, et Robin Duponnois, Directeur de l'Unité LSTM à laquelle j'appartient. Merci également à David Havet qui a suivi le cours de ma thèse au sein de Koniambo Nickel SAS ses deux dernières années.

Mes remerciements s'orientent ensuite vers mes deux directeurs de thèses : Marc Ducouso et Philippe Jourand. Marc qui s'est beaucoup investi dans ce projet, qui a toujours su trouver les mots qui calment en période de stress, qui a trouvé des solutions, qui m'a accompagné, et tout cela malgré les 22 000 km. Philippe a su trouver les solutions, les bons conseils, la rigueur qu'il me manquait parfois, son sens de l'organisation m'a été des plus précieux, pour le temps qu'il m'a accordé.

Je remercie ensuite Koniambo Nickel SAS pour m'avoir accueilli dans l'entreprise et pour avoir financé ma thèse. Merci aux principaux acteurs, Magali Patrois responsable du service Environnement, Revégétalisation et Biodiversité, qui a repris le projet en cours de route et qui a su apporter l'appui nécessaire à l'épanouissement du projet, à Antoine Leveau qui a initié le projet avec nous, pour son temps, son écoute, et sa motivation, merci à Elodie Bouye qui a suivi mon travail au cours des derniers mois de ma thèse, et à David Havet responsable du service HSEQR pour son écoute et les moyens mis à disposition. Merci à Laurent Védi d'avoir toujours été là pour m'aider, m'accompagner, toujours intéressé et motivé. Merci à Liz Henriot et à sa valeureuse équipe « pépinière ». Merci à Perrine, Julie,

Madeleine et Aurélie. Merci à Laurent Bordez, compagnon de galère pendant un temps. Merci à François Joussemet, qui m'a beaucoup aidé dans ce projet, j'espère que tu te complais dans tes études.

Merci à l'ANRT, d'avoir accepté d'accorder à ce projet un financement CIFRE.

Merci au Centre IRD de Nouméa qui m'a hébergé dans le laboratoire de la Plate Forme du Vivant. Merci à ces deux directeurs successif que j'ai rencontré : George De Noni et sa bonne humeur et Edouard Hnawia, pour leur accueil. Merci à Laurent Millet pour ses conseils, son accueil sur la Plate Forme du Vivant et son amitié. Merci Denise et Jenny pour votre bienveillance et votre amitié.

Merci à l'IAC et son Directeur Général, Laurent L'Huillier pour l'accueil chaleureux dans l'équipe de l'Axe 2. Merci à Fabian Carriconde pour ses conseils. Merci à Laurent Maggia, pour sa bienveillance et ses *Tristaniopsis callobuxus* qui me furent fort utile. Ils ont maintenant une seconde vie au grand air avant d'être immortalisés dans la littérature scientifique spécialisée. Merci à Bruno Fogliani, Anthony Pain pour leur aide toujours bienveillante. Merci à l'équipe de joyeuses drilles : Julia, camarade dans la même galère thésienne et grande amie, Julien et Véronique également camarades de galère thésienne, et les souris de laboratoire mais surtout des amies : Sarah, Kelly, Sylvie et Mélanie qui a su égayer le mur en face de mon bureau. Et merci à Valérie, Audrey, Giliane, Nadia, Marine, Laure, Estelle.

Merci au LSTM, de m'avoir accueilli dans son équipe ACE. Merci à Michel Lebrun, anciennement directeur du LSTM et maintenant à Robin Duponnois, actuel directeur et membre de mon jury. Merci à Frédéric Mahé qui m'a énormément aidé, et pour sa bienveillance. Merci à Bryan Vincent pour sa grande aide, pour son écoute, pour avoir toujours été là en cas de panique statistique, et pour son amitié. Merci à Laure Hannibal d'avoir ajouté de la joie et de la bonne humeur au bureau, et pour ses conseils. Merci à Antoine Galiana, pour ses conseils. Et merci à Charline, camarade de thèse, de congrès et de

promenade dans les souks de Marrakech. Merci à tous les stagiaires et thésards du LSTM : Emeline, Catherine, Zung, Roba et Sana.

Un grand merci à Farid Juillot et à Emmanuel Fritsch, pour leur connaissances, leur accompagnement, leur bienveillance. Leurs contributions à la partie « sol » de ma thèse a été décisive, notamment pour la rédaction de mon premier article. Merci à Magali, Robin et Estelle, pour les parties de tarot et leur amitié.

Merci à Drone Pacific Service pour leur générosité et leur participation dans ce projet.

Merci à toutes les personnes que j'ai pu rencontrer pendant la thèse et qui pour certains sont devenus des amis chers : Laura, Nicolas, Simon, Patrick, Aurélien, Charlotte, Sofia, Pauline, Quiterie, Maureen, Linda, Clarisse, Adrien, Thomas, Germain, Sandy, Françoise, Carole, Audrey, Ursule. Et merci à tous ceux que j'aurais pu malencontreusement oublier de citer.

Merci à David d'avoir été là et d'avoir supporté une thésarde qui peut parfois être ronchon.

Merci à ma famille,

A ma jumelle Lise pour son écoute, son soutien, sa présence quasi permanente même à 22 000 km.

Merci à ma grande sœur Sylvie et à mon grand frère David, pour leur présence, et à leurs enfants.

A mes parents Brigitte et Gérard de m'avoir soutenu et encouragé dans ce projet.



# Sommaire

<b>Résumé .....</b>	<b>3</b>
<b>Remerciements .....</b>	<b>5</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>11</b>
<b>Synthèse bibliographique : Rôles des symbioses racinaires dans la facilitation entre plantes : Application à la restauration écologique des écosystèmes dégradés.....</b>	<b>45</b>
<b>Chapitre 1 : Etude de la diversité ectomycorhizienne associée à <i>Acacia spirorbis</i> sur des sols contrastés de Nouvelle-Calédonie.....</b>	<b>59</b>
Introduction du Chapitre 1 .....	61
<b>Article 1 :</b> Ectomycorrhizal communities associated with the legume <i>Acacia spirorbis</i> growing on contrasted edaphic constraints in New Caledonia.....	63
<b>Chapitre 2 : La plante nurse <i>Acacia spirorbis</i> permet-t-elle d'améliorer le développement d'espèces cibles par l'enrichissement du sol en microorganismes ? .....</b>	<b>109</b>
Introduction du Chapitre 2 .....	111
<b>Article 2 :</b> Caractérisation des potentiels ectomycorhiziens des sols et des topsoils pour la restauration écologique d'un site dégradé assisté par le système plante nurse/plantes cibles.....	113
<b>Chapitre 3 : Potentiel de la plante nurse <i>A. spirorbis</i> pour la restauration du site minier du Koniambo avec <i>Tristaniopsis spp.</i> .....</b>	<b>155</b>
Introduction du Chapitre 3 .....	157
<b>Article 3 :</b> Utilisation d' <i>A. spirorbis</i> , plante ectomycorhizienne facilitatrice pour initier la restauration écologique d'un site minier dégradé avec des espèces endémiques. ....	159
<b>Article 4 :</b> Ectomycorrhizal facilitation using <i>Acacia spirorbis</i> Labill. as nurse plant enable to enhance ectomycorrhizal community composition of a target species: <i>Tristaniopsis callobuxus</i> Brongn. & Gris.....	193
<b>Conclusion générale .....</b>	<b>221</b>



## Introduction générale





La Nouvelle-Calédonie est un archipel situé dans le sud-ouest de l'océan pacifique à environ 1.200 km à l'Est des côtes australiennes (Figure 1) et 1.500 km au Nord de la Nouvelle-Zélande. Il est constitué d'un ensemble d'îles dont les principales sont La Grande Terre longue de 450 km pour 40 à 70 km de large, les îles Loyauté : Lifou, Tige, Maré et Ouvéa, l'île des Pins au Sud et Bélep au Nord. La présence d'un lagon inscrit depuis 2008 au patrimoine mondiale de l'humanité par l'UNESCO, sur une grande partie des côtes, est également à noter (UNESCO, 2008).

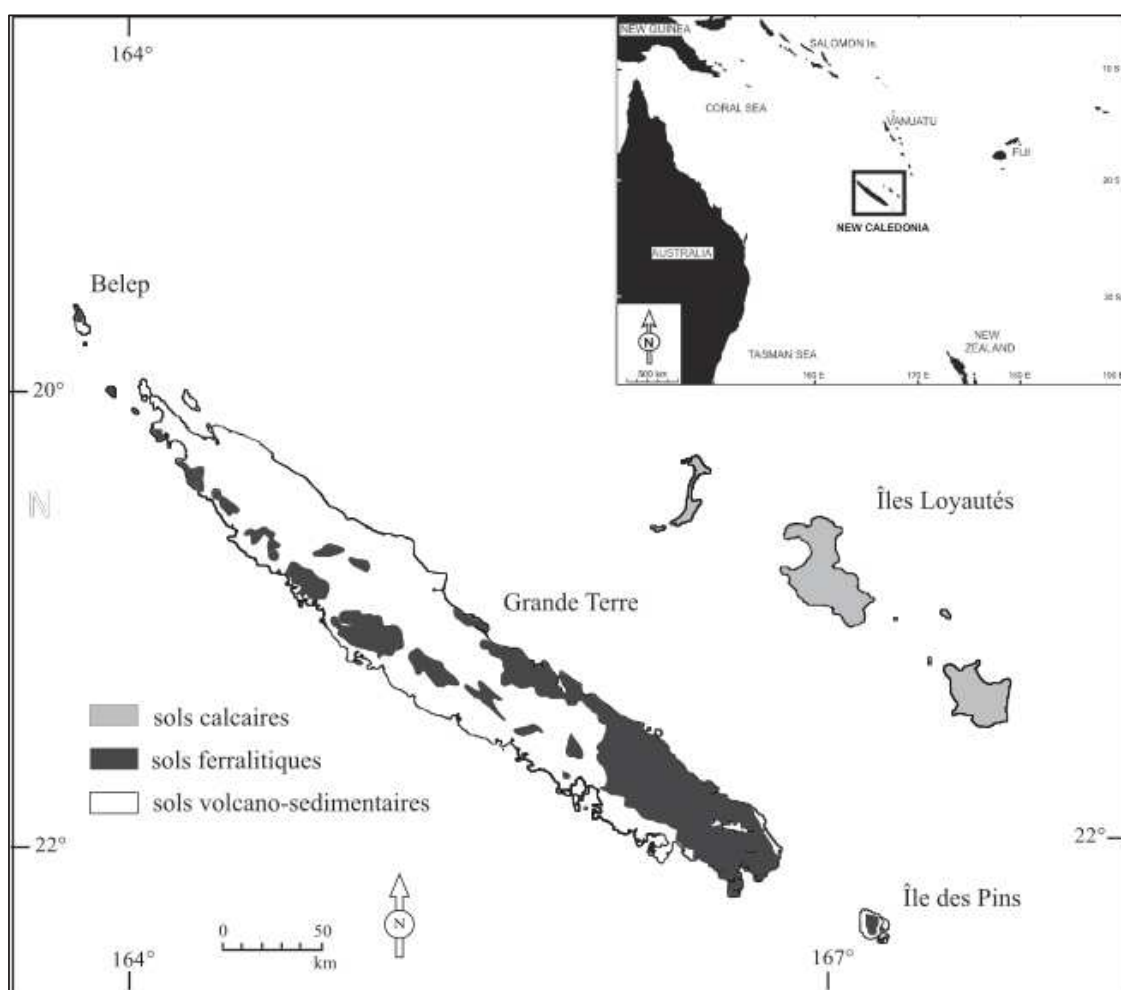


Figure 1 : Situation de la Nouvelle-Calédonie à l'est de l'Australie et au nord de la Nouvelle-Zélande ; répartition des trois principaux type de sols présent sur l'archipel.

### **1-1. Diversité des sols de la Nouvelle-Calédonie**

La Nouvelle-Calédonie, suite à une histoire géologique complexe, présente une très grande variété de sols. En effet, 20 types de sols sont référencés en Nouvelle-Calédonie, réunis en 8 grands groupes ou Reference Soil Groups (RSG) définis en fonction de l'épaisseur, de la nature de l'altération, de l'exportation de matières et du substrat rocheux de ces sols. Ces 8 RSG sont : les Régosols et Leptosols (sols peu évolués), les Vertisols (sols argileux gonflants), les Cambisols (sols bruns tropicaux) magnésiques, calcaires ou désaturés, les Acrisols (sols appauvris) développés sur les formations sédimentaires siliceuses, les Ferralsols et Plinthosols (latérites) fortement composés d'oxydes de fer et les Fluvisols, relativement riches en matières organiques (Fritsch, 2012 ; Latham et al., 1978).

La diversité de ces substrats est la conséquence d'un enchaînement de phénomènes géologiques dans cette région du monde. Les périodes successives de convergence et de relaxation des plaques Australienne et Pacifique depuis 65 millions d'années, ont conduit à un phénomène d'obduction au cours duquel le manteau océanique a chevauché une lanière de croûte continentale issue de l'Est-Gondwana, la ride de Norfolk, entraînant la remontée de celle-ci à travers le manteau océanique, à l'origine de l'actuelle Grande Terre (Maurizot and Vendé-Leclerc, 2012). La partie émergée de la Grande Terre, comprend de ce fait des résidus altérés et érodés de la nappe obductée de roches océaniques, les ophiolites, qui alternent avec les roches du bâti volcano-sédimentaire de la ride de Norfolk. Les sols y sont fortement altérés et épais à l'aplomb des anciennes surfaces cuirassées et à l'inverse rajeunis et peu évolués sur les surfaces d'érosion des rebords des massifs ophiolitiques (Fritsch, 2012). Les sols formés sur ces roches sont qualifiés d'ultrabasiques, et recouvrent 1/3 de la Grande Terre (Figure 1). Ils sont composés de péridotites et de serpentines. L'altération de ces roches a conduit à d'importantes exportations de Na, K et Ca, et aussi de Mg et de Si. Ce qui a de ce fait entraîné une accumulation résiduelle de métaux dans les sols (Fe, Al, Ni, Mn, Co, Cr...). D'un point de vue phytologique, ces sols sont extrêmement difficiles de par leur potentielle phytotoxicité liée à la présence de métaux lourds (Ni, Cr, Co et Mn), leur pauvreté en éléments nutritifs (N, P, K), le déséquilibre important du rapport Ca/Mg, cela ajouté aux faibles concentrations en matières organiques mais encore par la faible disponibilité en eau et la faible capacité d'échange cationique (Fritsch, 2012; Kazakou et

al., 2008; Latham et al., 1978). Ces altérations ont notamment été conditionnées par la pluviométrie et la capacité à exporter les éléments par drainage des différents sites, et sont fortement impliqués dans la diversité des sols de la Nouvelle-Calédonie, qui est étroitement lié aux substrats rocheux sur lesquels ils se sont formés : sols argileux sur basaltes, siliceux sur cherts, métalifères sur péridotites, alumineux et calcaires sur formations volcaniques et récifales des îles Loyautés (Fritsch, 2012).

## **1-2. La biodiversité terrestre de la Nouvelle-Calédonie**

La diversité des sols néo-calédoniens, additionnés aux conditions climatiques tropicales (forte hygrométrie et ensoleillement) et l'isolement géographique sont en grande partie à l'origine de l'importante biodiversité de l'île qui totalise 3.371 espèces de plantes vasculaires, endémiques pour 74,4 % d'entre-elles. Cet endémisme a été estimé à 85 % sur les substrats ultramafiques tels que ceux du massif du Koniambo (Isnard et al., 2016; Morat et al., 2012). La flore de ces substrats représente 35 % de la flore autochtone et 45,5 % de la flore endémique néo-calédonienne (Jaffré and L'huillier, 2010). C'est aussi l'une des plus grandes réserve en flore métalophyte du monde avec plus de 1.130 espèces métalophytes sur le territoire (Whiting et al., 2004).

Cette richesse de diversité ainsi que les menaces anthropiques telles que l'élevage extensif, l'urbanisation et l'exploitation minière du nickel font de la Nouvelle-Calédonie l'un des « hotspot » majeurs de la biodiversité terrestre, ces derniers regroupant les zones où il existe une grande diversité et un fort endémisme d'espèces subissant une destruction importante de leur habitat (Myers et al., 2000).

## **1-3. L'exploitation minière du nickel**

En plus d'être source de biodiversité, les sols ultrabasiques recèlent également la principale source économique de l'île, le nickel.

Produit sous forme de ferronickel (Figure 2), il est inscrit dans le patrimoine de la Nouvelle-Calédonie et représente environ 95 % des exportations du pays. En 2008, le secteur de l'industrie minière employait

6 % de la population active (Jaffré and L'huillier, 2010). Ce matériau est utilisé dans la fabrication de nombreux éléments, entre les aciers inoxydables.



Figure 2 : Pépites de ferronickel ([www.sln.nc](http://www.sln.nc)) obtenues par traitement pyrométallurgique du minerai de nickel.

L'altération des péridotites (Figure 3) qui a entraîné la redistribution et la concentration de certains éléments chimiques, dont le fer et le nickel au sein de roches nouvelles est à l'origine de la formation du minerai de nickel. Les minerais sont classés selon leur niveau d'altération et leur taux de nickel : la garniérite (< 35 %), la saprolite (< 2,5 %) et à un niveau d'altération plus avancé la latérite (0,5 à 2 %) qui a également des teneurs en hydroxydes d'oxydes de fer proche de 95 %.

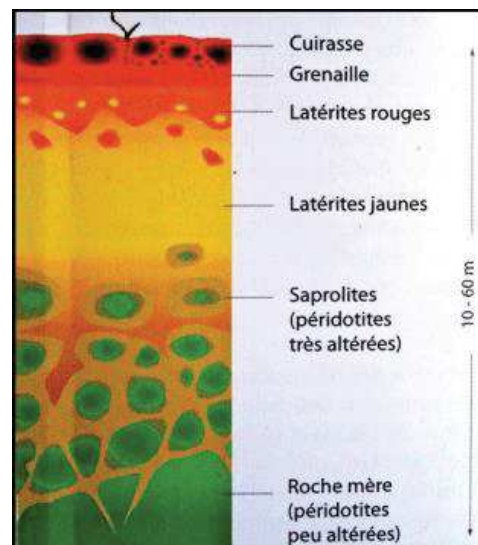


Figure 3 : Représentation schématique d'une coupe d'un substrat ultrabasique suite à l'altération des péridotites (Jaffré and L'huillier, 2010).

Il existe deux principaux types de minerais de nickel :

- Les minerais sulfurés (associés à des roches éruptives), que l'on exploite au sein de mines souterraines et qui représentent 20 % des réserves mondiales de nickel.
- Les minerais oxydés (associés en climat tropical, à des roches ultramafiques), que l'on exploite au sein de mines à ciel ouvert comme en Nouvelle-Calédonie qui constituent à elle seule 25 % des réserves mondiales.

Aujourd'hui, il existe en Nouvelle-Calédonie 17 centres miniers et métallurgiques, dont 3 usines de transformation parmi lesquels l'usine pyrométallurgique Koniambo Nickel SAS (Figure 4) qui exploite le massif du Koniambo situé sur la côte ouest de la Province Nord (Figure 5 ) et qui a commencé sa production en 2014.



Figure 4 : Vue partielle du complexe minier Koniambo Nickel SAS sur le site de Vavouto (Engineering and Mining Journal, décembre 2014).

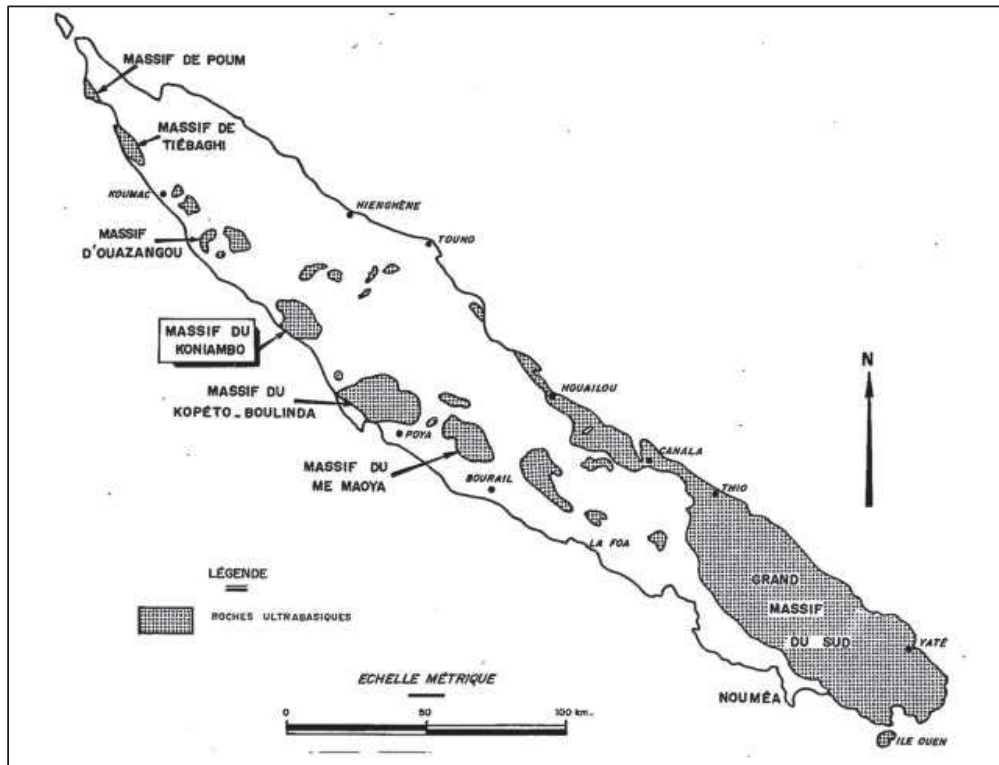


Figure 5 : Localisation du massif du Koniambo parmi les principaux massifs de roches ultrabasiques de Nouvelle-Calédonie (Jaffré, 1974).

Historiquement, l'exploitation du nickel a d'abord été focalisée sur la garniérite découverte en 1864 par Jules Garnier. Les mines ont été progressivement mécanisées et les techniques d'extraction améliorées. Les mineurs se sont ensuite intéressés à des roches aux teneurs plus faibles en nickel comme les saprolites et plus récemment les latérites. Ces dernières sont les roches les moins riches en nickel mais ce sont aussi les plus abondantes, leur exploitation a débuté à la fin des années 80. Ce minerai nécessite des techniques d'extraction particulière qui permettent d'envisager un développement de son exploitation dans les années à venir (Figure 6).

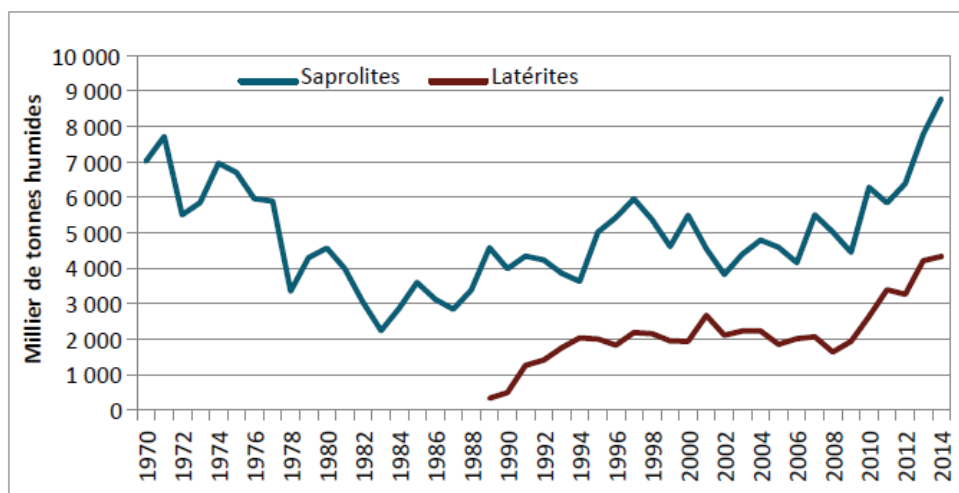


Figure 6 : Évolution de la production de minerais de nickel en Nouvelle-Calédonie en millier de tonnes humides (Isee).

Plus d'un siècle d'exploitation des mines à ciel ouvert en Nouvelle-Calédonie a grandement contribué à la modification des paysages (Figure 7a), s'exprimant par des zones décapées mettant à nu les roches et des amoncellements de déblais dits « stériles miniers », stockés sous forme de versers. Ces zones sont plus ou moins bien délimitées selon la période d'exploitation, les anciennes versers apparaissent mal délimitées tandis que les plus récentes sont mieux circonscrites, avec des structures en escalier pour mieux contrôler l'érosion. En 2007, la Direction de l'Industrie des Mines et de l'Energie de la Nouvelle-Calédonie (DIMENC) a recensé l'impact de l'activité minière à près de 20.000 ha de surface décapée, soit 1,2 % du territoire (Jaffré and L'huillier, 2010).

Les conséquences de ces zones décapées, sont l'accroissement des phénomènes d'érosion et d'engravement des cours d'eau qui génèrent une pollution des cours d'eaux et des rivages du lagon calédonien (Figure 7b).



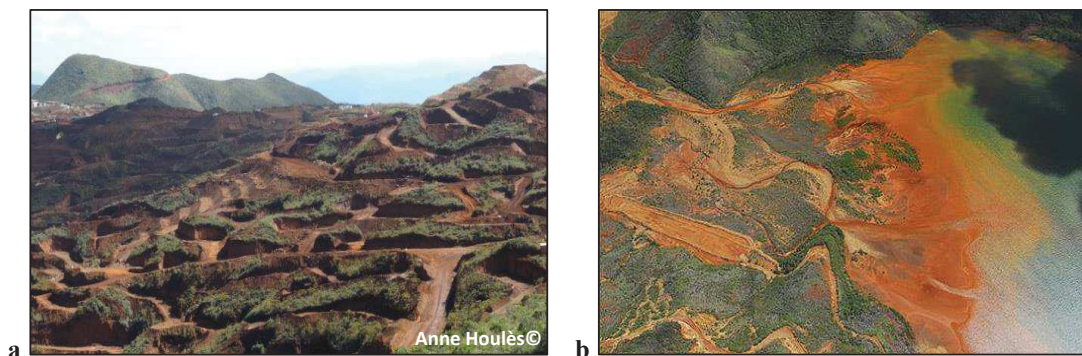


Figure 7 : a. Pistes de prospection dans un maquis minier d'altitude du massif du Koniambo dans la zone d'exploitation de Trazy ; b. Hypersédimentation d'éléments fins issus des zones Péréae et Voyageurs du massif de Canala après ruissellement dans la baie de Ouango sur la côte est de la grande terre.

Ces altérations entraînent la perturbation des écosystèmes et la réduction des effectifs des espèces animales et végétales présents sur ces zones, qui sont déjà impactés directement par l'activité minière. Ces phénomènes de réductions peuvent être la cause d'une perte de biodiversité globale et entraîner le dépérissement de certaines espèces dont les effectifs deviennent insuffisants pour assurer le maintien de la diversité génétique (Honnay and Jacquemyn, 2007; Oostermeijer et al., 2003). Les écosystèmes touchés par l'activité minière étant déjà dans une situation critique par leur faible étendue naturelle, les risques de pertes en biodiversité n'en sont que plus augmentés. C'est le cas de certains biotopes qui ne comportent que des espèces à faible répartition comme par exemple *Araucaria nemorosa* de Laub. à Port Boisé ou *Boronella koniambiensis* (Däniker) T.G.Hartley sur le massif du Koniambo (Kettle et al., 2007).

Aujourd'hui, l'exploitation du nickel est réglementée et exige de prendre en compte l'impact sur l'environnement. Ainsi, depuis le 1<sup>er</sup> mai 2008, le Code Minier est applicable en Nouvelle-Calédonie. Il a pour objectif la clarification de la réglementation minière concernant le nickel, le chrome et le cobalt. Il prévoit, entre autre, une étude d'impact de la zone avant exploitation, la constitution par l'exploitant d'un schéma de réhabilitation ainsi que son engagement à réparer les dégâts occasionnés par son activité (L'Huillier et al., 2010).



#### 1-4. La revégétalisation des sites miniers de Nouvelle-Calédonie.

En Nouvelle-Calédonie, la prise de conscience de la nécessité de revégétaliser les sites miniers après exploitation a débutée dans les années 1970, pendant la période dite du « boom du nickel » où l'impact visuel de l'activité minière commença à atteindre un stade alarmant (L'Huillier et al., 2010).

Les premiers essais de revégétalisation de sites miniers furent engagés en 1971 par le Centre Technique Forestier Tropical (CTFT) devenu par la suite en 1984 le département forestier du Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD) avec la collaboration de l'Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer (ORSTOM) devenu aujourd'hui l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD). Ces essais ont d'abord consisté à tester une diversité d'espèces exotiques et locales (Poaceae diverses, Pin des Caraïbes, Acacias australiens, etc.) afin de déterminer celles capables de se développer dans ces environnements dégradés et sous très fortes contraintes édaphiques (Jaffré Tanguy, 1976). Deux espèces natives de la Nouvelle-Calédonie se sont révélées particulièrement performantes en termes de survie et de croissance : *Acacia spirorbis* Labill. et *Casuarina collina* J.Poiss. ex Pancher & Sebert (Cherrier, 1990). Ces deux espèces ont par la suite été utilisées à outrance pour les programmes de revégétalisation et se sont révélées dans de nombreux cas, être des espèces bloquant l'évolution de l'écosystème. En fait, les peuplements vieillissants de ces espèces laissant très peu de place à l'implantation spontanée de nouvelles espèces, la mort ou les chablis des individus âgés engendraient une reprise importante de l'érosion. Ainsi, ces plantations ne remplissaient plus leur rôle principal de protection des sols contre l'érosion ; au contraire, elles avaient tendance à l'aggraver. Ce constat a conduit entre 1988 et 1991 l'ORSTOM en partenariat avec la Société Le Nickel (SLN) à réaliser un inventaire de la flore des maquis miniers pour trouver, dans cette flore locale, des espèces endémiques capables de se développer par semis ou par plantation, dans le cadre de la revégétalisation des zones impactées par l'activité minière (Jaffré and Rigault, 1991; Jaffré et al., 1994; Pelletier and Esterle, 1995). Les résultats ont fait l'objet d'un manuel publié par la SLN (Jaffré and Pelletier, 1992).

Aujourd'hui, la revégétalisation privilégie l'utilisation des espèces natives et endémiques de la zone impactée (Jaffré and Pelletier, 1992). L'utilisation d'*A. spirorbis* et de *C. collina* a été réduite à cause

de leurs effets à longs termes sur la très faible diversification spontanée de la plantation, les reprises aggravées de l'érosion et également car ces espèces sont natives des maquis de basses altitudes et des plaines et non des maquis minier d'altitude principalement impactés par les activités minières.

A ce jour, beaucoup d'espèces végétales restent très difficiles à produire en pépinière et une grande partie des espèces s'implantent très difficilement sur les zones à réhabiliter (L'Huillier et al., 2010) et génèrent des frais très élevés. L'efficacité du travail de revégétalisation reste très modeste malgré des efforts importants depuis les années 1970. Pour remédier cette situation, le développement et l'amélioration des techniques actuelles de revégétalisation apparaissent plus que jamais indispensables.

En fonction de l'objectif à atteindre, les techniques de revégétalisation ont été divisées en trois catégories : la réaffectation, la réhabilitation et la restauration écologique (Encadré 1 : Les différentes approches pour la revégétalisation des milieux dégradés). En Nouvelle-Calédonie, ces trois catégories de techniques cohabitent dans le quotidien de la gestion d'un massif minier en exploitation. Ainsi, les talus créés à l'ouverture des pistes sont revégétalisés avec des mélanges de graminées à croissance rapide qui sont fertilisés afin de contenir le plus rapidement possible l'érosion. Cette réaffectation sera maintenue jusqu'à la fermeture de la piste. Les pistes abandonnées temporairement sont réhabilitées avec différentes espèces en fonction de l'altitude. Les pistes définitivement fermées, les surfaces décapées pour l'extraction du minerai et les versets de stérile minier sont soit réhabilités sur le modèle des pistes temporairement abandonnées soit font l'objet d'essais de restauration écologique.

Dans les massifs miniers de la Nouvelle-Calédonie, les itinéraires techniques de réaffectation sont réalisés avec des mélanges de graines, principalement des graminées exotiques projetées sous pression dans un mulch aqueux collant, teint en vert et contenant une fertilisation NPK de base (Figure 8a). Ce procédé appelé « hydroseeding » apporte une solution rapide et efficace pour contenir l'érosion des talus (L'Huillier et al., 2010). Par contre, l'usage de graminées exotiques est controversé. Pour palier ce problème, des travaux ont été menés (Lagrange, 2010) afin de remplacer ces graminées par des cypéracées endémiques comme *Costularia comosa* (C.B. Clarke) Kük, *Schoenus neocaledonicus* C.B. Clarke, *Baumea deplanchei* Boeck. Dans ce cadre, des champs semenciers ont été installés pour fournir des graines de qualité. A ce jour, le développement de l'hydroseeding avec des graines de cypéracée se

heurte toujours à une production insuffisante de graines de qualité pour fournir les besoins de la revégétalisation. Les itinéraires techniques de réhabilitation sont réalisés essentiellement par plantation et pour partie par semis (L'Huillier et al., 2010) (Figure 8b). Une des principales contraintes est la fourniture de graines de qualité et ensuite la maîtrise de la production des plants en pépinière ; l'utilisation de bouture restreint à quelques espèces reste marginal et la division de touffe ne concerne que les cypéracées. Ainsi sur l'ensemble des 3.371 espèces de plantes vasculaires, seul une centaine est produite régulièrement en pépinière pour la revégétalisation des sites miniers. Afin d'accroître la diversité des plantes utilisées, le recours à la transplantation, consistant à prélever des plantes dans un écosystème qui va être détruit afin de les replanter dans les terrains à réhabiliter est également utilisée. Cette méthode est souvent combinée, depuis les années 2000, avec l'apport de terre végétale ou « topsoil », par référence à la couche de sol superficielle en interaction avec les racines des plantes, issue des écosystèmes détruits (L'Huillier et al., 2010). Le topsoil est en général utilisé après une période de stockage qui altère ses capacités d'apport en semences viables et de fertilisation des plantations (Bordez, 2015). Afin d'optimiser l'usage des topsoils sur le massif du Koniambo, leur caractérisation a été réalisée et leurs conditions de stockage étudiées entre 2011 et 2015. Il en ressort quelques préconisations : une limitation de la durée de stockage à 6 mois dans des verses d'au maximum 10 m de hauteur ; la durée de stockage peut être légèrement augmentée sans altérer les qualités du topsoil si l'épaisseur de la verse est réduite (Bordez, 2015). Dans ces travaux sur les topsoils (Bordez, 2015), une attention particulière a été portée sur leurs composantes microbiennes, bactéries et champignons qui semblent peu affectées par le stockage. Au final, les techniques de réhabilitation utilisées depuis les années 1990, fondées essentiellement sur des plantations, restent coûteuses à mettre en œuvre et concernent les zones les plus faciles d'accès. La restauration écologique reste à l'état expérimental et nécessite d'avoir un recul plus important sur l'évolution du fonctionnement des plantations. Dans ce cadre les travaux les plus récents visent à utiliser la facilitation (Badano et al., 2011; Duponnois et al., 2013; Henry, 2015; Yang et al., 2009) entre plantes de différentes espèces dans le cadre d'une stratégie plantes nurses/plantes cibles. Il est à noter que sensu stricto, la restauration écologique n'est pas possible sur la plupart des zones d'exploitation du nickel en Nouvelle-Calédonie. En effet, dans les zones impactées, la roche mère est souvent à l'affleurement et le sol d'origine est totalement disparu. Dans ces

conditions nous n'avons aucune information sur l'écosystème d'origine par absence de référentiel, ni aucune information sur ce qu'il pourrait être. L'objectif est alors plus de réimplanter un écosystème qui apporte des services écosystémiques équivalent aux écosystèmes d'origine.

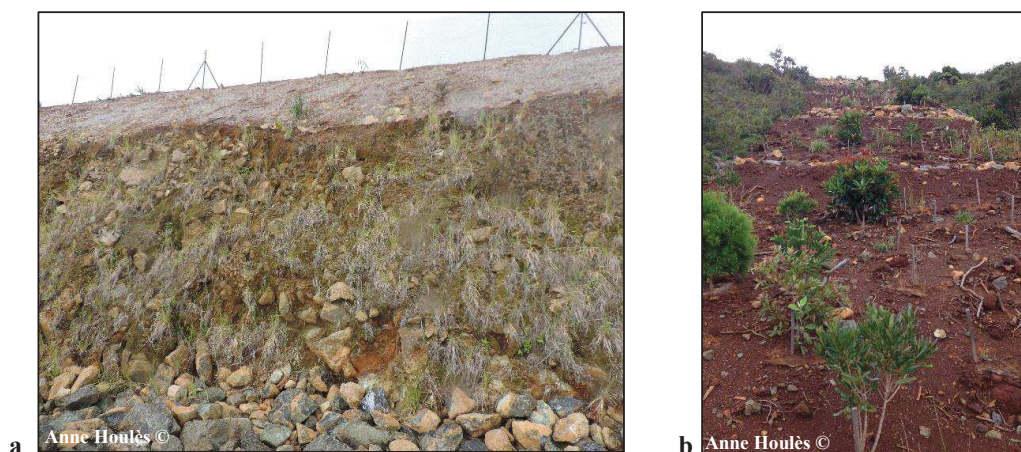


Figure 8 : a. Talus de piste traité par hydroseeding avec un mélange de graminées ; massif du Koniambo ; b : plantation réalisée dans le cadre de la réhabilitation d'une ancienne piste.

#### 1-5. La stratégie plantes nurses/plantes cibles

Au sein d'un écosystème, les plantes interagissent qu'elles soient de la même espèce ou non. Les sommes de ces interactions aboutissent à la formation d'écosystèmes complexes en équilibre dynamique. Ainsi, suivant la situation d'une espèce dans un écosystème, des traits de caractères peuvent être définis, comme les plantes héliophiles et les plantes sciaphiles. Ces deux traits permettent d'illustrer la compétition que pourront se faire deux plantes héliophiles pour atteindre la canopée et ainsi bénéficier de la lumière dont elles ont besoin et la facilitation dont bénéficient les plantes sciaphiles qui s'épanouissent à l'ombre des plantes héliophiles. Ces deux mécanismes, la compétition qui peut être définie comme la « rivalité » entre espèces vivantes pour l'accès aux ressources du milieu et la facilitation qui peut être définie comme une relation entre deux espèces vivantes, relation qui profite à au moins un des participants sans causer aucun dommage à l'autre ; la relation peut même, dans certains cas, être profitable aux deux participants. Ces relations de compétition et de facilitation cohabitent au sein des écosystèmes ; leurs importances relatives étant variables en fonction des contraintes du milieu.

Les interactions de compétition entre les plantes seront dominantes dans des conditions peu stressantes tandis que les interactions de facilitation seront dominantes en cas de stress abiotique élevé, c'est le phénomène de Stress gradient hypothesis illustré Figure 9 (Bertness and Callaway, 1994; Brooker et al., 2008; Callaway et al., 1997; Choler et al., 2001; Holmgren and Scheffer, 2010; Kawai and Tokeshi, 2007; Maestre et al., 2009).

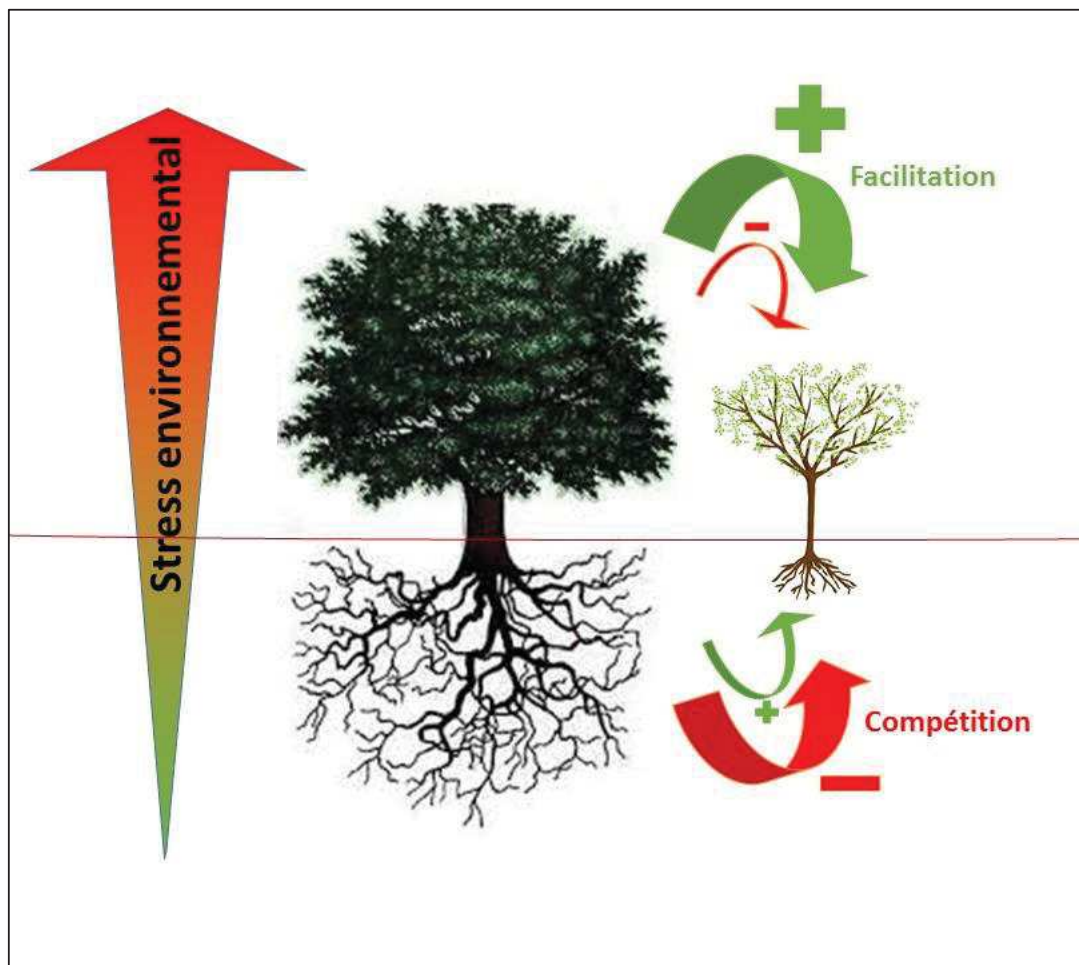


Figure 9: Stress Gradient Hypothesis : Modification des interactions positives et négatives entre plantes en fonction du niveau de contrainte de l'environnement. Les flèches rouges représentent les interactions négatives comme la compétition, et les flèches vertes représentent les interactions positives comme la facilitation. L'épaisseur des flèches représente l'intensité de ces interactions

Les sols ferralitiques développés sur les ophiolites dans les massifs miniers de la Nouvelle-Calédonie présentent des contraintes extrêmes, notamment en termes de capacité d'échanges cationiques limitées entre autres par des teneurs en hydroxydes d'oxydes de fer souvent supérieures à 90 %, une toxicité polymétallique avec des teneurs importantes en Ni, Cr, Co et Mn, de très faibles teneurs en N, P et K (avec des concentrations très inférieures à celles des métaux lourds) et un déséquilibre important du rapport Ca/Mg par un excès de Mg. Dans ces conditions extrêmes, la facilitation est exacerbée et la compétition est réduite. Ces conditions sont donc favorables à la mise en place d'une stratégie plantes nurses / plantes cibles pour développer des itinéraires techniques de restauration écologique des maquis miniers après exploitation (Cf Encadré 2 : Le système plantes nurses / plantes cibles ; (Henry et al., 2016; Herrera et al., 2007; Héry et al., 2005)).

Pour mettre en place une telle stratégie, nous savons également que les compositions phylogénétiques des communautés microbiennes des sols varient en fonction du couvert végétal et de son niveau de dégradation (Bordez et al., 2016; Herrera et al., 2007; Héry et al., 2005)). Dans le cas des exploitations minières à ciel ouvert de la Nouvelle-Calédonie, la dégradation des écosystèmes est extrême avec une élimination systématique de la végétation et du top soil. Les terrains ainsi décapés, souvent jusqu'à la roche mère sont maintenus dans cet état parfois pendant plusieurs décennies avant que leur revégétalisation ne soit envisagée. Dans ces conditions, les capacités d'autorégénération de l'écosystème ne peuvent plus fonctionner (Figure 1 de l'Encadré 1) et il est nécessaire de conduire des travaux qui permettront le rétablissement simultané d'un couvert végétal associé à une communauté microbienne compatible avec ce couvert végétal.

Parmi les microorganismes qui composent ces communautés, certains ont un rôle bénéfique sur la croissance des plantes, notamment les microorganismes symbiotiques. Les symbioses mycorhiziennes qui accompagnent les plantes vasculaires depuis leur émergence il y a 460 MA et les symbioses fixatrices d'azote sont très largement documentées pour leurs effets sur les plantes (Chaintreuil et al., 2007; Héry et al., 2005; Jourand et al., 2014; Smith et al., 2007; Tedersoo et al., 2014; Wang and Qiu, 2006), mais également pour leurs implications potentielles ou avérées dans la facilitation entre plantes (Henry et al., 2016; Hortal et al., 2013; Ortega-Larrocea et al., 2010; Padilla and Pugnaire, 2006), (Cf Encadré 3 : Les



symbioses mycorhiziennes arbusculaire et ectomycorhizienne). Le principal intérêt des symbioses fixatrices d'azote est de réduire l'azote de l'air pour le rendre assimilable par les plantes. Cette capacité est limitée à un très faible nombre de taxons, les légumineuses et les plantes actinorhiziennes (Doyle and Luckow, 2003; Franche et al., 2009) et confère à ces plantes une relative indépendance vis-à-vis de l'azote du sol (Rosenblueth and Martinez-Romero, 2006). Ainsi, les plantes fixatrices d'azote sont souvent évoquées pour leur capacité, dans les écosystèmes jeunes, à augmenter le pool d'azote disponible pour les plantes (Galiana et al., 2004). Les symbioses mycorhiziennes concernent 92% des familles de plantes terrestres et 80% des espèces répertoriées (Bonfante and Genre, 2010; Wang and Qiu, 2006) et permettent d'assurer de meilleurs échanges de l'eau et des nutriments, notamment des minéraux du sol et des sucres issus de la photosynthèse, entre les partenaires plantes et champignons de cette symbiose (Bonfante and Genre, 2010; Garbaye, 2013; Padilla and Pugnaire, 2006). Différentes méthodes ont été appliquées pour classer les mycorhizes en différents types. Essentiellement sur la base de caractères anatomiques, morphologiques et indirectement taxonomiques on distingue notamment les mycorhizes arbusculaires qui représentent le type mycorhizien ancestral et qui sont les plus largement représentées chez les plantes terrestres (Wang and Qiu, 2006), ainsi que les ectomycorhizes qui, même si elles ne concernent qu'un nombre limité de taxon (3 %) (Ducousso and Hamir, 2010), concernent pour la plupart des espèces forestières dominantes des forêts boréales, tempérées, méditerranéennes et de certaines forêts tropicales notamment le miombo et les forêts soudanaises africaines, les forêts malgaches, les forêts à Diptérocarpacees du sud-est asiatique et la plupart des forêts australiennes (Tedersoo et al., 2014; Wardle and Lindahl, 2014).

Dans le contexte post minier, lors de la réhabilitation d'un site, les communautés microbiennes est notamment symbiotiques sont très, trop différentes des communautés d'origine pour faciliter l'implantation des végétaux, qu'ils soient semés ou plantés (Hartmann et al., 2012; Héry et al., 2005; Jumpponen et al., 2002; Lazaruk et al., 2005) et leur remplacement par des communautés microbiennes adaptées aux communautés végétales conduit dans la plupart des cas à l'échec de la plantation ou du semi. En effet, les champignons, notamment mycorhiziens ont des capacités de dispersion limitées (Peay et al., 2012), la recolonisation par des vecteurs naturels pourrait s'avérer extrêmement longue, trop

longue pour permettre un contrôle suffisant de l'érosion du sol pour l'établissement d'une végétation protectrice. Pour favoriser le retour des propagules fongiques, le recours au topsoil est une solution efficace sous réserve d'un stockage qui en préserve les qualités. Hélas, les disponibilités en topsoil sont limitées et seul environ 15 % des surfaces à revégétaliser pourront bénéficier de cette pratique. La réintroduction de champignons mycorhiziens dans un sol peut être faite par inoculation des plants en pépinière, le succès de l'inoculation *in situ* étant quasi nulle (Ducousso and Hamir, 2010). Mais cette méthode est coûteuse, difficile à mettre en place à grande échelle et se limite à la réintroduction de quelques souches alors que les cortèges mycorhiziens associés naturellement à un arbre sont le plus souvent composés de plusieurs dizaines d'espèces de champignons (Smith et al., 2013). De plus, ce système implique l'isolement et la culture contrôlée des souches mycorhizienne à réintroduire, une étape qui peut se révéler longue et difficile, voire impossible pour beaucoup d'espèces. Cette étape peut être d'autant plus fastidieuse si la zone à réhabiliter impose de n'utiliser que des souches indigènes, car l'introduction de souches exotiques peut être risquée dans le sens où elle peut potentiellement créer une concurrence interspécifiques jusqu'à aboutir à l'élimination de l'un des concurrents (Selosse, 1997). Une autre solution pour la réintroduction d'une communauté microbienne adaptée est d'établir une plante capable de croître dans ces conditions difficiles et d'agir comme piège pour permettre le développement *in situ* d'une diversité de champignons mycorhiziens. La principale limite de ce procédé réside dans la compatibilité des champignons mycorhiziens piégés par la plante nurse pour les plantes cibles.

#### **1-7. *Acacia spirorbis*, une plante nurse à fort potentiel**

En 1825 Labillardière a décrit une nouvelle espèce d'*Acacia* en Nouvelle-Calédonie et l'a nommée : *A. spirorbis*). En 1864, Benthham a décrit une nouvelle espèce d'*Acacia* en Australie et l'a nommée *Acacia solandri* Benth. Les proximités taxonomiques de ces deux espèces ont conduit Pedley à proposer d'amender la description originale de Benthham pour placer *A. solandri* comme une sous espèce d'*A. spirorbis* et de la nommer *A. spirorbis* subsp *solandri* (Benth.) (Pedley, 1990). *De facto*, le taxon néo-calédonien est devenu une sous espèce d'*A. spirorbis* nommée *A. spirorbis* subsp *spirorbis* Labill.



(Pedley, 1990). Dans la suite de ce document, pour faciliter la lecture, *A. spirorbis* fera référence à la sous espèce néo-calédonienne *A. spirorbis* subsp *spirorbis*.

En Nouvelle-Calédonie, *A. spirorbis* (Figure 10) est un petit arbre très commun et très largement répandu, notamment sur la côte ouest où on le trouve sur une très large variété de sols : ferrallitiques, volcano-sédimentaires et calcaires. Sa capacité à pousser dans des conditions extrêmes comme les sites miniers après exploitation a conduit les services environnementaux des compagnies minières à l'utiliser très largement pour la revégétalisation (Jaffré et al., 1994).



Figure 10: *Acacia spirorbis* sur le Koniambo, Trazy.

La capacité d'*A. spirorbis* à développer une triple symbiose sur ses racines : nodosité fixatrice d'azote avec des rhizobium (Grangeteau C, 2012), mycorhizes arbusculaires (AM) avec des Glomérormycètes et ectomycorhizes (ECM) avec principalement des Basidiomycètes et Ascomycètes (Ducousso et al., 2010; Jourand et al., 2014) est évoquée pour expliquer son adaptation à des contraintes édaphiques aussi variées qu'extrêmes. Ce caractère triple symbiotique n'est connue que pour un nombre très limité de plantes, notamment certains *Acacia* australiens (Reddell and Warren, 1987) et certaines plantes actinorhiziennes (Duponnois et al., 2007). Donc, *A. spirorbis* est présent sur des sols : calcaires et aluminiques sur les îles Loyautés, métallifères et ultrabasiques à la base des massifs miniers, sur les

cherts riches en silice du Nord de l'île ou encore les sols argileux et les sables blancs. Cette espèce a donc la capacité de se développer sur une large gamme de substrats contraignants, en présence de toxicités polymétalliques (Co, Cr, Mn et Ni), à des teneurs faibles en nutriments, et à une large gamme de pH (de 4 à 8). Le seul facteur qui semble limiter son développement est l'altitude, en effet les germinations d'*A. spirorbis* ne sont plus observées au-delà de 400 m. Toutefois, des plantations de jeunes arbres sur des massifs miniers à plus de 900 mètres ont abouti avec un accroissement normal de l'arbre, mais sans régénérations (Grangeteau C, 2012). Cette capacité d'adaptation hors normes, validée par sa sur-utilisation pour la réhabilitation des mines de nickel après exploitation nous a conduit à explorer le potentiel de plante nurse de cette espèce.

#### **1-8. Objectif et approche expérimentale pour le développement d'un itinéraire technique de restauration écologique des maquis miniers impactés par l'activité minière.**

Dans le cadre de la concession d'une mine, le code minier de la Nouvelle-Calédonie prévoit, en cas de renouvellement, la charge à l'exploitant de produire le cas échéant, un état des lieux des mesures et du calendrier envisagés pour la réhabilitation des zones dégradées à l'intérieur du périmètre de la concession (Code minier de la Nouvelle-Calédonie, Article R. 131-8-1 5°). Même si le code minier semble assez souple, dans les faits, la pression citoyenne, relayé par différentes associations et *in fine* par les pouvoirs publics oblige les compagnies minières à mettre en œuvre dans le cadre des ICPE (Installation Classée Pour l'Environnement), des mesures d'atténuation, de compensation et de réparation des atteintes provoqués aux écosystèmes du fait de l'exploitation minière. Ces mesures prévoient notamment la réhabilitation des sites, mais, faute d'itinéraire technique connu, ces mesures ne peuvent pas inclure la restauration écologique des sites. L'objectif principal de cette thèse sera de poser les bases d'un itinéraire technique fondé sur le système plante nurse – plantes cibles, pour la restauration écologique des maquis miniers dégradés. Dans le cadre de la Nouvelle-Calédonie et compte tenu des essais de revégétalisation menés depuis les années 1970 (Jaffré, 1974), nous avons choisi d'étudier les potentialités d'*A. spirorbis* pour son utilisation comme plante nurse avec des espèces du genre *Tristaniopsis* Brongn. & Gris. comme plantes cibles. Ainsi, après un exposé de nos connaissances de ce

système et de son fonctionnement, une synthèse de l'état de nos connaissances du rôle des symbioses racinaires dans le fonctionnement du système plante nurse – plantes cibles sera présenté. Ensuite, dans trois chapitres expérimentaux, nous nous sommes efforcés à apporter des connaissances nouvelles permettant de cerner les potentialités d'*A. spirorbis* comme plante nurse. Ainsi, nous avons décrit dans une première étude la diversité des champignons ectomycorhiziens avec lesquels *A. spirorbis* est associé dans la diversité des sols où cette espèce se développe spontanément. Ensuite, nous avons décrit les communautés ectomycorhiziennes établies naturellement sous *A. spirorbis* et sous *Tristaniopsis guillainii* Vieill. Ex Brongn. & Gris sur le massif de Koniambo afin d'estimer dans un essai en pépinière leur compatibilité et la capacité d'*A. spirorbis* d'agir comme une plante nurse pour l'établissement de *Tristaniopsis*. Enfin, nous avons établi des plantations expérimentales afin d'évaluer la capacité et les limites d'*A. spirorbis* à favoriser l'implantation de *T. guillainii*.

### Encadré 1 : Les différentes approches pour la revégétalisation des milieux dégradés

La mise en place de successions végétales sur terrains dégradés est définie par différents niveaux en fonction du niveau de dégradation de l'écosystème (Figure 1).

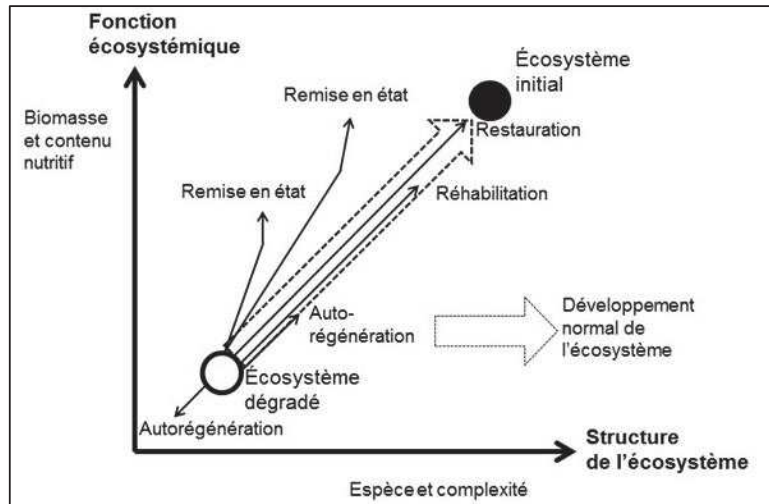


Figure 1: Représentation graphique des différentes approches pour la revégétalisation en fonction du niveau de dégradation d'un écosystème (Bradshaw, 1997).

De façon schématique, on distingue trois principaux itinéraires techniques de revégétalisation : la réaffectation, la réhabilitation et la restauration écologique.

- La **réaffectation**, consiste en la mise en place d'un **couvert végétal différent de celui d'origine** et ne tient nullement compte l'écosystème d'origine.
- La **réhabilitation**, consiste en la mise en place d'une couverture végétale ayant pour vocation de repositionner rapidement un écosystème endommagé dans une trajectoire favorable, proche de la trajectoire naturelle ou non. Cette voix prend en compte la régulation des débits hydrique et la limitation des phénomènes d'érosion, mais **sans prendre en compte le biotope initial**.
- La **restauration** écologique, consiste à mettre en place un couvert végétal sur un système dégradé en prenant en compte l'ensemble du biotope originel, au niveau de la diversité, de la structure et des fonctions initiales (Aronson et al., 1995).

La Society for Ecological Restoration (SER 2004) définit la restauration écologique comme le processus qui assiste l'autoréparation d'un écosystème dégradé, endommagé ou détruit (Aronson et al., 2006). L'objectif de ce processus est de transformer un milieu dégradé afin de rétablir l'écosystème d'origine notamment en termes de couverture végétale, de biodiversité, de limitation de l'érosion et de régulation des débits hydriques. L'application de ces principes de réhabilitation est mentionnée dans l'International Council on Mining & Metals (ICMM) qui a édité le fascicule Good practice Guidance for Mining and Biodiversity (L'Huillier et al., 2010).

## Encadré 2 : Le système plante nurse

Les interactions de facilitation regroupent toute influence positive d'un organisme sur un autre. Concernant les plantes, bien qu'étant un processus très répandu dans les écosystèmes forestiers, la facilitation n'est étudiée que depuis ces deux dernières décennies, ainsi il y a encore peu d'applications à la restauration écologique (Brooker et al., 2008) (Brooker et al., 2008). Le système plante nurse est l'une de ces applications de la facilitation entre plantes.

Dans le cas du système plante nurse, la proximité entre la plante nurse et le plant cible permettrait un meilleur développement comparé à un individu isolé (Figure 1). Les avantages apportés par la plante nurse étant de réduire l'évaporation, limiter les fluctuations de température du sol et de l'air, augmenter la disponibilité des nutriments et des minéraux par l'accumulation de litière, accroître la disponibilité en eau par le phénomène « hydraulic lift » consistant à faire remonter l'eau située en profondeur dans les couches superficielles du sol avec les racines, et enfin favoriser le développement des communautés microbiennes symbiotiques (bactéries, champignons) (Padilla and Pugnaire, 2006).

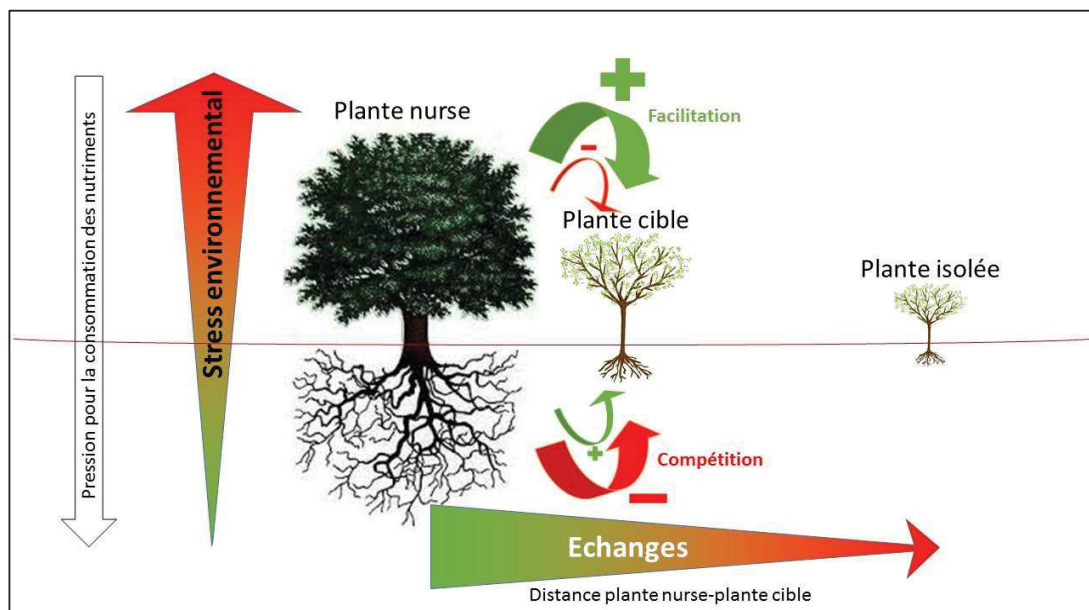


Figure 1 : Interactions entre la plante nurse et la plante cible en fonction du stress environnemental et de la distance. Les flèches rouges représentant les interactions négatives (compétition) et les flèches vertes les interactions positives (échanges). Le caractère positif à négatif des paramètres stress et distance est modélisé par une graduation allant du vert au rouge.

Côté fonctionnement, la facilitation entre plantes serait corrélée avec le stress environnemental. Cette théorie, le « Stress Gradient Hypothesis » implique qu'en cas de faible stress environnemental il y a compétition entre les plantes car plus de pression pour la consommation des nutriments, tandis qu'en cas de fort stress environnemental, les plantes vont à l'inverse s'entraider (Le Bagousse-Pinguet et al., 2012; Bertness and Callaway, 1994).

### Encadré 3 : Les symbioses mycorhiziennes

La symbiose mycorhizienne est l'association mutualiste entre une plante et un champignon. Cette symbiose a lieu au niveau des racines fines de la plante (radicelles) et va permettre l'échange d'éléments minéraux, d'eau et de carbone entre la plante et le champignon via la mycorhize, l'organe symbiotique (Smith et al., 2007). Cette symbiose permettrait également une meilleure adaptation aux stress édaphiques tels que la présence de métaux toxiques dans les sols (Jourand et al., 2014).



Figure 1 : Photographies d'ectomycorhizes de *Pisolithus albus* sur des racines d'*A. spirorbis* (à gauche) et d'un manchon ectomycorhizien grossi à la loupe (à droite)

On distingue les ectomycorhizes (Figure 1) qui développent un manchon mycélien à l'extérieur de la racine à partir duquel des hyphes se développent pour créer un réseau entre les cellules du rhizoderme et ainsi former le réseau de Hartig, lieu des échanges symbiotique entre la plante et le champignon ; des endomycorhizes qui se développent à l'intérieur de la racine sous la forme d'un arbuscule (Figure 2) (Ducousso and Hamir, 2010). Une particularité des ectomycorhizes est le fonctionnement en succession, ainsi un arbre collectera des partenaires ectomycorhiziens différents au cours de sa vie (Ducousso and Hamir, 2010).

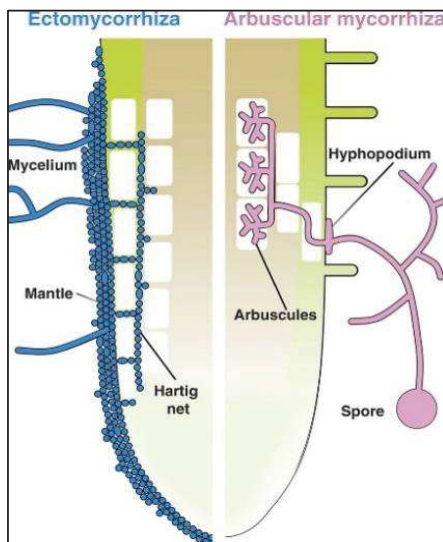


Figure 2 : Illustration de la colonisation d'une racine par des champignons mycorhiziens: ectomycorhiziens (bleu) et endomycorhiziens (rose). (Bonfante P. and Genre A., 2010, Nature communications 1: 48).

Les ectomycorhizes sont essentiellement des champignons basidiomycètes qui sont associés à environ 20 familles de plantes ligneuses et concernent généralement des espèces grégaires dominant la canopée (Ducousso et al., 2008). Ces plantes représentent 3 % de la biodiversité végétale mondiale et sont présentes sur tous les continents, mais on les retrouve essentiellement dans les zones climatiques subarctiques (forêts boréales) en zone tempérées et méditerranéennes. Peu de données sont rassemblées en zone tropicale, mais il a été démontré que certaines essences ectomycorhiziennes structuraient certaines forêts tropicales (Tedersoo et al., 2010).



## Références bibliographiques

- Aronson, J., C, F., Le Floch, H, E., Ovalle, C., and Pontanier, R. (1995). Restauration et réhabilitation des écosystèmes dégradés en zones arides et semi-arides. Le vocabulaire et les concepts. Chapitre 2. L'homme peut-il refaire ce qu'il a dé fait? (Paris).
- Aronson, J., Clewell, A.F., Blignaut, J.N., and Milton, S.J. (2006). Ecological restoration : A new frontier for nature conservation and economics. *14*.
- Badano, E.I., Samour-Nieva, O.R., and Flores, J. (2011). Emulating nurse plants to restore oak forests. *Ecol. Eng.* 37, 1244–1248.
- Le Bagousse-Pinguet, Y., Liancourt, P., Gross, N., and Straile, D. (2012). Indirect facilitation promotes macrophyte survival and growth in freshwater ecosystems threatened by eutrophication. *J. Ecol.* 100, 530–538.
- Bertness, M.D., and Callaway, R. (1994). Positive interactions in communities. *Trends Ecol. Evol.* 9, 187–191.
- Bonfante, P., and Genre, A. (2010). Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nat. Commun.* 1, 48.
- Bordez, L. (2015). Stratégies de re-végétalisation des maquis miniers nickélifères de Nouvelle-Calédonie : étude sur les potentiels biologiques des topsoils et leur gestion en vue de leur utilisation pour la restauration écologique du milieu dégradé. Université de la Nouvelle-Calédonie- École doctorale du Pacifique ED469.
- Bordez, L., Jourand, P., Ducousso, M., Carriconde, F., Cavaloc, Y., Santini, S., Claverie, J.M., Wantiez, L., Leveau, A., and Amir, H. (2016). Distribution patterns of microbial communities in ultramafic landscape: A metagenetic approach highlights the strong relationships between diversity and environmental traits. *Mol. Ecol.* 2258–2272.
- Brooker, R.W., Maestre, F.T., Callaway, R.M., Lortie, C.L., Cavieres, L.A., Kunstler, G., Liancourt, P., Tielbörger, K., Travis, J.M.J., Anthelme, F., et al. (2008). Facilitation in plant communities: The past, the present, and the future. *J. Ecol.* 96, 18–34.
- Callaway, R.M., Walker, L.R., and Oct, N. (1997). Competition and Facilitation : A Synthetic Approach to Interactions in Plant Communities. *Ecology* 78, 1958–1965.

- Chaintreuil, C., Rigault, F., Moulin, L., Jaffré, T., Fardoux, J., Giraud, E., Dreyfus, B., and Bailly, X. (2007). Nickel resistance determinants in bradyrhizobium strains from nodules of the endemic New Caledonia legume *Serianthes calycina*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 8018–8022.
- Cherrier, J.-F. (1990). Reverdissement des terrains miniers en Nouvelle Calédonie. *Bois Forêts Des Trop.* 225, 5–23.
- Choler, P., Michalet, R., and Callaway, R.M. (2001). Facilitation and Competition on Gradients in Alpine Plant Communities. *Ecology* 82, 3295–3308.
- Doyle, J.J., and Luckow, M.A. (2003). The Rest of the Iceberg . Legume Diversity and Evolution in a Phylogenetic Context 1. *Plant Physiol.* 131, 900–910.
- Ducousso, M., and Hamir, A. (2010). Les bactéries et les champignons du sol sur roches ultramafiques. In *Mines et Environnement de Nouvelle-Calédonie*, pp. 129–144.
- Ducousso, M., Ramanankierana, H., Duponnois, R., Rabévohitra, R., Randrihasipara, L., Vincelette, M., Dreyfus, B., and Prin, Y. (2008). Mycorrhizal status of native trees and shrubs from eastern Madagascar littoral forests with special emphasis on one new ectomycorrhizal endemic family, the Asteropeiaceae. *New Phytol.* 178, 233–238.
- Ducousso, M., Proust, S., and Kpenou, A. (2010). Premier inventaire des champignons (macromycètes) de quatre forêts sèches de Nouvelle-Calédonie. *Rapport n°07/2010.* 24.
- Duponnois, R., Prin, Y., Baudoin, E., Galiana, A., and Dreyfus, B. (2007). Les champignons mycorrhiziens : une composante majeure dans les processus biologiques régissant la stabilité et la productivité des écosystèmes forestiers tropicaux. In *Le Projet Majeur Africain de La Grande Muraille Verte*, pp. 421–440.
- Duponnois, R., Ramanankierana, H., Hafidi, M., Baohanta, R., Baudoin, E., Bâ, A., Galiana, A., Bally, R., Lebrun, M., and Prin, Y. (2013). Des ressources végétales endémiques pour optimiser durablement les opérations de réhabilitation du couvert forestier en milieu méditerranéen et tropical : exemple des plantes facilitatrices vectrices de propagation des champignons mycorrhiziens. In *Panafrican Colloquium Daka 2012*, pp. 265–272.
- Franche, C., Lindström, K., and Elmerich, C. (2009). Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant Soil* 321, 35–59.



- Fritsch, E. (2012). Les sols. In Atlas de La Nouvelle-Calédonie, p. 15.
- Galiana, A., Bouillet, J.-P., and Ganry, F. (2004). The importance of biological nitrogen fixation by trees in agroforestry. Symbiotic nitrogen fixation. Prospect for enhanced application in tropical agriculture. *Sci. Publ.* 185–199.
- Garbaye, J. (2013). La Symbiose mycorhizienne : une association entre les plantes et les champignons.
- Grangeteau C (2012). Diversity of nitrogen fixing bacteria associated to the New Caledonian ubiquitous tree *Acacia spirorbis*. In European Geoscience Union, General Assembly, (vienna), p.
- Hartmann, M., Howes, C.G., Vaninsberghe, D., Yu, H., Bachar, D., Christen, R., Nilsson, R.H., Hallam, S.J., and Mohn, W.W. (2012). Significant and persistent impact of timber harvesting on soil microbial communities in Northern coniferous forests. *ISME J.* 6, 2199–2218.
- Henry, C. (2015). Stimuler les communautés mycorhiziennes par des plantes nurses pour la restauration écologique: exemple d'une forêt tropicale malgache après exploitation minière. AgroParisTech.
- Henry, C., Raivoarisoa, J.-F., Razafimamonjy, A., Ramanankierana, H., Andrianaivomahefa, P., Ducouso, M., and Selosse, M.-A. (2016). Transfer to forest nurseries significantly affects mycorrhizal community composition of *Asteropeia mcphersonii* wildings. *Mycorrhiza*.
- Herrera, A., Héry, M., Stach, J.E.M., Jaffré, T., Normand, P., and Navarro, E. (2007). Species richness and phylogenetic diversity comparisons of soil microbial communities affected by nickel-mining and revegetation efforts in New Caledonia. *Eur. J. Soil Biol.* 43, 130–139.
- Héry, M., Philippot, L., Mériaux, E., Poly, F., Le Roux, X., and Navarro, E. (2005). Nickel mine spoils revegetation attempts: Effect of pioneer plants on two functional bacterial communities involved in the N-cycle. *Environ. Microbiol.* 7, 486–498.
- Holmgren, M., and Scheffer, M. (2010). Strong facilitation in mild environments: The stress gradient hypothesis revisited. *J. Ecol.* 98, 1269–1275.
- Honnay, O., and Jacquemyn, H. (2007). Susceptibility of Common and Rare Plant Species to the Genetic Consequences of Habitat Fragmentation. *Conserv. Biol.* 21, 823–831.
- Hortal, S., Bastida, F., Armas, C., Lozano, Y.M., Moreno, J.L., García, C., and Pugnaire, F.I. (2013). Soil microbial community under a nurse-plant species changes in composition, biomass and activity as the nurse grows. *Soil Biol. Biochem.* 64, 139–146.

- Isnard, S., L'huillier, L., Rigault, F., and Jaffré, T. (2016). How did the ultramafic soils shape the flora of the New Caledonian hotspot? *Plant Soil* 403, 53–76.
- Jaffré, T. (1974). La végétation et la flore d'un massif de roches ultrabasiques de Nouvelle- Calédonie: le Koniambo. *Candollea* 29, 427–456.
- Jaffré, T., and L'huillier, L. (2010). La végétation des roches ultramafiques ou terrains miniers. In *Mines et Environnement En Nouvelle-Calédonie*, pp. 45–103.
- Jaffré, T., and Pelletier, B. (1992). Plantes de Nouvelle-Calédonie permettant de revégétaliser des sites miniers.
- Jaffré, T., and Rigault, F. (1991). Recherches sur les possibilités d'implantation végétale sur sites miniers (rapport final).
- Jaffré, T., Rigaults, F., and Sarrailh, J. (1994). Des anciens sites miniers. *Bois Forêts Des Trop.*
- Jaffré Tanguy, L.M. (1976). Recherches sur les possibilités d'implantation végétale sur déblais miniers : rapport final.
- Jourand, P., Hannibal, L., Majorel, C., Mengant, S., Ducousso, M., and Lebrun, M. (2014). Ectomycorrhizal *Pisolithus albus* inoculation of *Acacia spirorbis* and *Eucalyptus globulus* grown in ultramafic topsoil enhances plant growth and mineral nutrition while limits metal uptake. *J. Plant Physiol.* 171, 164–172.
- Jumpponen, A., Högberg, P., Huss-Danell, K., and Mulder, C.P.H. (2002). Interspecific and spatial differences in nitrogen uptake in monocultures and two-species mixtures in north European grasslands. *Funct. Ecol.* 2002 16, 454–461.
- Kawai, T., and Tokeshi, M. (2007). Testing the facilitation-competition paradigm under the stress-gradient hypothesis: decoupling multiple stress factors. *Proc. Biol. Sci.* 274, 2503–2508.
- Kazakou, E., Dimitrakopoulos, P.G., Baker, A.J.M., Reeves, R.D., and Troumbis, A.Y. (2008). Hypotheses , mechanisms and trade-offs of tolerance and adaptation to serpentine soils : from species to ecosystem level. *Biol. Rev.* 83, 495–508.
- Kettle, C.J., Hollingsworth, P.M., Jaffré, T., Moran, B., and Ennos, R.A. (2007). Identifying the early genetic consequences of habitat degradation in a highly threatened tropical conifer , *Araucaria nemorosa* Laubenfels. *Mol. Ecol.* 16, 3581–3591.

- L'Huillier, L., Wulff, A., Gâteblé, G., Fogliani, B., Zongo, C., and Jaffré, T. (2010). La restauration des sites miniers. In *Mines et Environnement de Nouvelle-Calédonie*, pp. 147–230.
- Lagrange, A. (2010). Etudes ecologique et microbiologique des espèces du genre *Costularia* (Cyperaceae) pionnières des sols ultramafiques de Nouvelle-Calédonie : applications à la restauration écologique. Université de Nouvelle-Calédonie.
- Latham, M., Quantin, P., and Aubert, G. (1978). Étude des sols de la Nouvelle-Calédonie. Nouvel essai sur la classification, la caractérisation, la pédogenèse et les aptitudes des sols de Nouvelle-Calédonie. Notice explicative n°78 (Paris).
- Lazaruk, L.W., Kernaghan, G., Macdonald, S.E., and Khasa, D. (2005). Effects of partial cutting on the ectomycorrhizae of *Picea glauca* forests in northwestern Alberta. *Can. J. For. Restor.* 35, 1442–1454.
- Maestre, F.T., Callaway, R.M., Valladares, F., and Lortie, C.J. (2009). Refining the stress-gradient hypothesis for competition and facilitation in plant communities. *J. Ecol.* 97, 199–205.
- Maurizot, P., and Vendé-Leclerc, M. (2012). La géomorphie. In *Atlas de La Nouvelle-Calédonie*, p. 14.
- Morat, P., Jaffré, T., Tronchet, F., Munzinger, J., Pillon, Y., Veillon, J., Chalopin, M., Birnbaum, P., Rigault, F., Dagostini, G., et al. (2012). Le référentiel taxonomique Florical et les caractéristiques de la flore vasculaire indigène de la Nouvelle-Calédonie. *BioOne* 34, 179–221.
- Myers, N., Mittermeier, R. a, Mittermeier, C.G., da Fonseca, G. a, and Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403, 853–858.
- Oostermeijer, J.G.B., Luijten, S.H., and Nijs, J.C.M. Den (2003). Integrating demographic and genetic approaches in plant conservation. *Biol. Conserv.* 113, 389–398.
- Ortega-Larrocea, M.D.P., Xoconostle-Cázares, B., Maldonado-Mendoza, I.E., Carrillo-González, R., Hernández-Hernández, J., Garduño, M.D., López-Meyer, M., Gómez-Flores, L., and González-Chávez, M.D.C. a (2010). Plant and fungal biodiversity from metal mine wastes under remediation at Zimapán, Hidalgo, Mexico. *Environ. Pollut.* 158, 1922–1931.
- Padilla, F.M., and Pugnaire, F.I. (2006). The role of nurse plants in the restoration of degraded environments. *Front. Ecol. Environ.* 4, 196–202.
- Peay, K.G., Schubert, M.G., Nguyen, N.H., and Bruns, T.D. (2012). Measuring ectomycorrhizal fungal

- dispersal: Macroecological patterns driven by microscopic propagules. *Mol. Ecol.* *21*, 4122–4136.
- Pedley, L. (1990). Leguminosae *Acacia spirorbis* Labill. subsp. *solandri* (Benth.). *Austrobaileya* *3*, 216.
- Pelletier, B., and Esterle, M. (1995). Revegetation of nickel mines in New Caledonia. In *Quelle Recherche Française En Environnement Dans Le Pacifique Sud ? Bilan et Perspectives*, p. 9.
- Reddell, P., and Warren, R. (1987). Inoculation of *Acacia* with mycorrhizal fungi: potential benefits. In *ACIAR Proceedings*, (Camberra, Australia), pp. 50–53.
- Rosenblueth, M., and Martinez-Romero, E. (2006). Bacterial Endophytes and Their Interactions with Hosts. *Mol. Plant-Microbe Interactions* *19*, 827–837.
- Selosse, M.A. (1997). Introduire Des Souches Ectomycorhiziennes Exotiques : Faits et conséquences potentielles. *Rev. For. Fr.* 185–197.
- Smith, M.E., Douhan, G.W., and Rizzo, D.M. (2007). Ectomycorrhizal community structure in a xeric *Quercus* woodland based on rDNA sequence analysis of sporocarps and pooled roots. *New Phytol.* *174*, 847–863.
- Smith, M.E., Henkel, T.W., Uehling, J.K., Fremier, A.K., Clarke, H.D., and Vilgalys, R. (2013). The Ectomycorrhizal Fungal Community in a Neotropical Forest Dominated by the Endemic *Dipterocarp Pakaraimaea dipterocarpacea*. *PLoS One* *8*, 1–13.
- Tedersoo, L., May, T.W., and Smith, M.E. (2010). Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: Global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza* *20*, 217–263.
- Tedersoo, L., Bahram, M., Pölme, S., Kõljalg, U., Yorou, N.S., Wijesundera, R., Ruiz, L.V., Vasco-palacios, A.M., Thu, P.Q., Suija, A., et al. (2014). Global diversity and geography of soil fungi. *Science* *346*, 1052–1053.
- Wang, B., and Qiu, Y.L. (2006). Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* *16*, 299–363.
- Wardle, D. a., and Lindahl, B.D. (2014). Disentangling global soil fungal diversity. *Science* *346*, 1052–1053.
- Whiting, S.N., Reeves, R.D., Richards, D., Johnson, M.S., Cooke, J.A., Malaisse, F., Paton, A., Smith, J.A.C., Angle, J.S., Chaney, R.L., et al. (2004). Research priorities for conservation of

metallophyte biodiversity and its sustainable uses in ecological restoration and site remediation.

Restor. Ecol. 12, 106–116.

Yang, L., Liu, N., Ren, H., and Wang, J. (2009). Facilitation by two exotic Acacia: *Acacia auriculiformis* and *Acacia mangium* as nurse plants in South China. For. Ecol. Manage. 257, 1786–1793.



## Synthèse bibliographique

Rôles des symbioses racinaires dans la facilitation entre plantes :

Application à la restauration écologique des écosystèmes dégradés





**Synthèse bibliographique : Rôles des symbioses racinaires dans la facilitation entre plantes :  
application à la restauration écologique des écosystèmes dégradés**

**Résumé**

La facilitation est une situation où la présence d'une espèce est favorable à une autre espèce sans causer de dommage à cette espèce. Dans le cas des plantes, les symbioses racinaires sont régulièrement évoquées pour leurs rôles dans la facilitation. Après avoir précisé les définitions de la facilitation en écologie, des symbioses racinaires, de la dégradation d'un écosystème et de restauration écologique, une synthèse des travaux relatifs aux rôles de trois types de symbioses racinaires : i) les mycorhizes arbusculaires, ii) les ectomycorhizes et iii) la fixation biologique de l'azote est proposée en portant une attention particulière à l'application de la facilitation entre plante dans les itinéraires techniques de restauration écologique des écosystèmes dégradés.

**Mots clés :** Mycorhizes arbusculaires, Ectomycorhizes, Fixation d'azote, Facilitation, Ecosystème dégradé, Restauration écologique.

Afin de faire un bilan de nos connaissances des rôles des symbioses mycorhiziennes comme médiateur de la facilitation entre plantes et notamment leurs applications à la restauration écologique des écosystèmes dégradés, il est nécessaire de préciser quelques définitions, notamment la facilitation, la symbiose, la notion d'écosystème dégradé et la restauration écologique.

### ***La Facilitation***

En écologie, la facilitation est définie comme une situation où la présence d'une espèce est favorable à l'installation et la vie d'une autre espèce sans que cette interaction soit défavorable à cette espèce (Bruno et al., 2003 ; Callaway, 1995). Dans certains cas, cette interaction peut être favorable aux deux espèces ; en aucun cas la facilitation peut être évoquée si la présence d'une espèce cause un dommage à l'autre (Stachowicz, 2001). La facilitation ne peut pas être considérée comme une symbiose car, dans le cas de la facilitation, il n'y a pas de mise en place d'une entité symbiotique spécifique siège des échanges à bénéfices réciproques entre les partenaires de la symbiose (Bradford and Schwab, 2013). Enfin, la facilitation est considérée comme une interaction positive entre espèces au contraire de la compétition qui est une interaction négative. La facilitation est un processus écologique qui concerne les espèces qu'elles soient animales, végétales, microbiennes, etc. La facilitation peut donc faire intervenir des organismes appartenant à des règnes différents comme les plantes et les bactéries ou les plantes et les champignons. Dans cette synthèse, nous aborderons la facilitation entre plantes et notamment le rôle de la symbiose mycorhizienne dans cette interaction positive. Dans le cas où la facilitation permet à une plante de s'installer du fait de la présence antérieure d'une autre, cette dernière est appelée plante nurse (Callaway, 1995).

### ***Les symbioses racinaires***

Dans son acception actuelle adaptée de la définition proposée par De Bary (1879), la symbiose est définie comme une association à avantages ou inconvénients réciproques, partagés entre deux espèces différentes avec des bénéfices pour la nouvelle entité qu'elles forment. Les plantes sont connues pour leurs capacités à former des symbioses au niveau de leurs racines notamment avec des microorganismes

fongiques et bactériens. Ainsi environ 70 % des plantes vasculaires forment des mycorhizes arbusculaires avec des champignons de la classe des Glomérormycètes (Wang and Qiu, 2006). Cette symbiose apparue il y a plus de 400 MA a accompagné l'émergence des plantes vasculaires terrestres (Remy et al., 1994). Depuis, différentes symbioses racinaires ont émergés, notamment les ectomycorhizes qui unissent en général des plantes ligneuses avec essentiellement des Basidiomycètes et des Ascomycètes. Même si les ectomycorhizes ne concernent que 3 % des taxons végétaux, elles ont une importance particulière du fait qu'elles concernent essentiellement des arbres dominant des forêts tempérées, boréales, méditerranéennes et de certaines forêts tropicales, notamment celles du sud-est asiatique. Les mycorhizes ont été particulièrement étudiées pour leurs rôles dans l'amélioration générale de la physiologie de la plante hôte par l'apport de carbone de la plante vers le champignon qui en retour fourni la plante en eau et en éléments nutritifs, notamment le phosphore (Smith and Read, 2008). La symbiose mycorhizienne joue également un rôle clé pour la défense contre les agressions biotiques et abiotiques du sol (Selosse et al., 2004). Ainsi, Jourand et al., 2010 ont mis en évidence le rôle d'un champignon ectomycorhizien, *Pisolithus albus* dans la résistance au nickel de sa plante hôte. La croissance des plantes peut être très limitée voire impossible en absence de symbiose avec des champignons mycorhiziens dans les environnements difficiles (Cázares et al., 2005). Mais ce sont les réseaux de mycélium établis dans le sol par les champignons qui fondent les capacités des mycorhizes à permettre la facilitation entre plantes (Selosse et al., 2006 ; Simard et al., 2012). En effet, une plante peut fournir à une autre de l'inoculum fongique sous la forme du réseau mycélien qu'elle a établi dans le sol et ainsi faciliter son installation. Ce type de relation où l'effet « nurse » est supporté par le réseau mycélien commun a déjà été observé pour les ectomycorhizes (Horton et al., 1999 ; Richard et al., 2009). Dans ces cas, les champignons doivent nécessairement être aptes à former des ectomycorhizes avec la plante nurse et la plante cible.

Une autre symbiose reconnue pour son importance unie les racines de certaines plantes à des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote. Les plantes associées à ces bactéries ont été divisées en deux grands groupes : les plantes actinorhiziennes qui forment des nodosités fixatrices d'azote avec des bactéries du genre *Frankia* et les légumineuses (Fabacées pour la plupart) qui forment des nodosités fixatrices

d'azote avec des rhizobiums. Les rhizobiums appartiennent aux sous-classes des alpha-protéobactéries et des bêta-protéobactéries et sont répartis dans plusieurs genres, notamment *Rhizobium*, *Ensifer*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Cupriavidus*, etc. Le fonctionnement de cette symbiose contribue de fait à affranchir la plante du stock d'azote du sol. A terme, la plante fixatrice contribuera à introduire de l'azote dans le système, potentiellement au profit d'autres espèces végétales dans le cadre d'une facilitation entre plantes.

### ***La notion d'écosystème dégradé***

Un écosystème est un ensemble composé par l'association des êtres vivants qui s'y trouve, en interaction avec leur environnement biologique, géologique, édaphique, climatique, hydrologique qui définissent le biotope (Tansley, 1935). Les espèces composant un écosystème échangent de l'énergie et de la matière afin de permettre le maintien et le développement de la vie dans le cadre d'un équilibre dynamique ; l'écosystème étant en perpétuel évolution. Une altération des échanges qu'ils soient d'énergie ou de matière peut aboutir à une dégradation de l'écosystème (Wali, 1999). La dégradation d'un écosystème est alors constatée par une diminution persistante de sa capacité à fournir des services (Chopra et al., 2005). La dégradation peut être d'une origine naturelle, humaine ou de l'interaction des deux. Ainsi, une pression humaine peut fragiliser, sans le dégrader un écosystème. La survenance d'une catastrophe naturelle sur un écosystème fragilisé peut alors engendrer sa dégradation. Les causes anthropiques de dégradation d'un écosystème peuvent être classées en cinq catégories ; i) les pollutions qui vont avoir un ou des effets sur la santé d'un ou plusieurs groupes fonctionnels qui composent l'écosystème, ii) la surexploitation qui va altérer les équilibres entre les différents groupes fonctionnels, voir même en faire disparaître certains, iii) l'introduction d'espèces envahissantes qui vont occuper des niches écologiques entraînant la réduction voir l'extinction des espèces qui les occupaient auparavant, iv) la déforestation qui consiste en supprimant un groupe fonctionnel de l'écosystème à provoquer des désordres majeurs sur l'ensemble des composantes de l'écosystème avec une perte importante de biodiversité et une destruction des habitats pour certaines espèces et enfin v) la fragmentation qui

consiste en la réduction d'un habitat continu en fragments d'habitats plus petits et isolés les uns des autres (Eriksson and Ehrlén, 2001).

Cette dégradation peut être mesurée de différentes façons : soit de façon quantitative en mesurant notamment la perte d'un service soit d'une façon plus qualitative en estimant la capacité de l'écosystème à restaurer ses capacités antérieures à fournir des services. Un élément important à prendre en compte est la capacité d'autoréparation d'un écosystème dégradé.

### ***La restauration écologique***

La Society for Ecological Restoration (SER 2004) définit la restauration écologique comme le processus qui assiste l'autoréparation d'un écosystème dégradé, endommagé ou détruit (Aronson et al., 2006). L'objectif de ce processus est de transformer un milieu dégradé afin de rétablir l'écosystème d'origine notamment en termes de couverture végétale, de biodiversité, de limitation de l'érosion et de régulation des débits hydriques. L'application de ces principes de réhabilitation est mentionnée dans l'International Council on Mining & Metals (ICMM) qui a édité le fascicule Good practice Guidance for Mining and Biodiversity (L'Huillier et al., 2010).

La mise en place de successions végétales sur terrains dégradés est définie par différents niveaux en fonction du niveau de dégradation de l'écosystème (Figure 1).

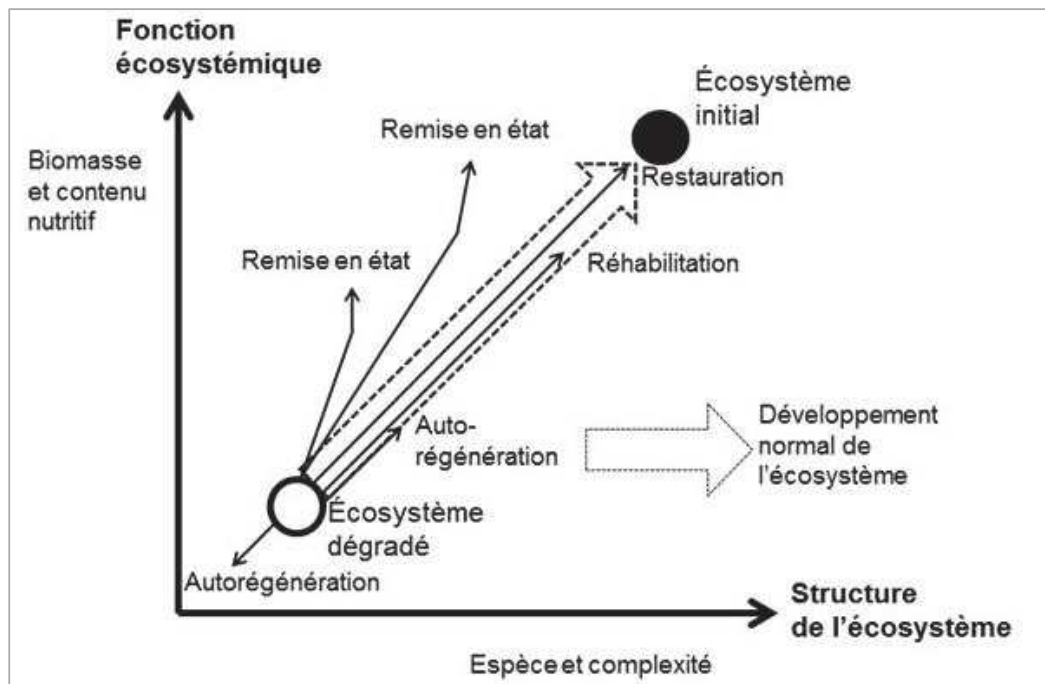


Figure 10 : Représentation graphique des différentes approches pour la revégétalisation en fonction du niveau de dégradation d'un écosystème (Bradshaw, 1997).

### *La facilitation entre plantes*

Comme énoncé précédemment, les interactions de facilitation regroupent toute influence positive d'un organisme sur un autre. Concernant les plantes, bien qu'étant un processus très répandu dans les écosystèmes forestiers, la facilitation n'est étudiée que depuis ces deux dernières décennies, ainsi il y a encore peu d'applications à la restauration écologique (Brooker et al., 2008). Le système plante nurse est l'une de ces applications de la facilitation entre plantes.

Dans le cas du système plante nurse, la proximité entre la plante nurse et la plante cible permettrait un meilleur développement comparé à un individu isolé (Figure 2). Les avantages apportés par la plante nurse étant de réduire l'évaporation, limiter les fluctuations de température du sol et de l'air, augmenter la disponibilité des nutriments et des minéraux par l'accumulation de litière, accroître la disponibilité en eau par le phénomène « hydraulic lift » consistant à faire remonter l'eau située en profondeur dans

les couches superficielles du sol avec les racines, et enfin favoriser le développement des communautés microbiennes symbiotiques : bactéries et champignons (Padilla and Pugnaire, 2006).

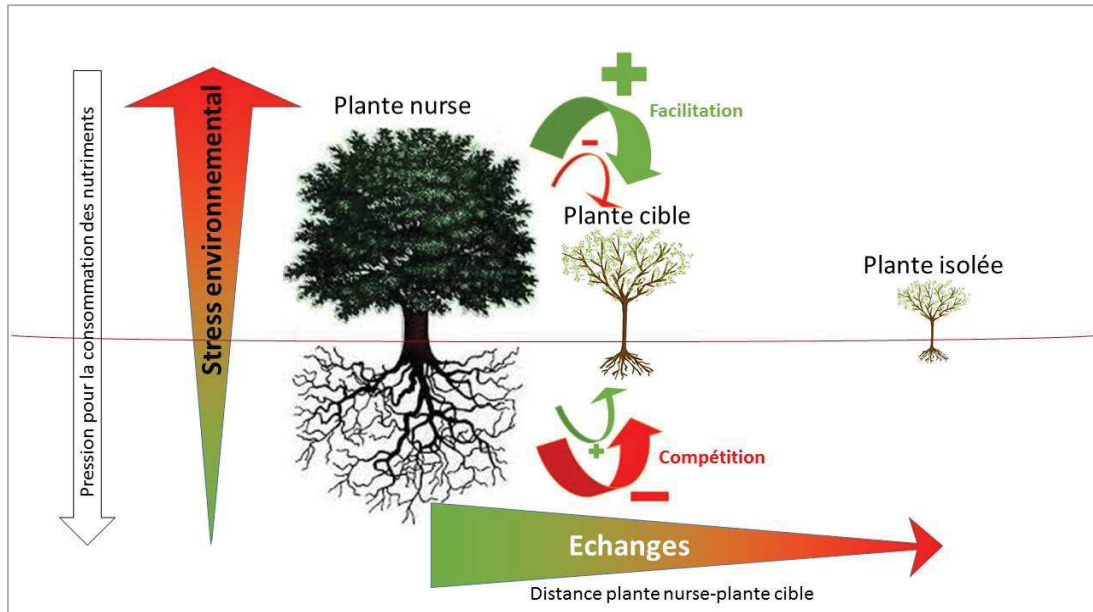


Figure 11: Interactions entre la plante nurse et la plante cible en fonction du stress environnemental et de la distance. Les flèches rouges représentant les interactions négatives (compétition) et les flèches vertes les interactions positives (facilitation). Le caractère positif à négatif des paramètres stress et distance est modélisé par une graduation allant du vert au rouge.

Côté fonctionnement, la facilitation entre plantes serait corrélée avec le stress environnemental. Cette théorie, le « Stress Gradient Hypothesis » implique qu'en cas de faible stress environnemental il y a compétition entre les plantes car plus de pression pour la consommation des nutriments, tandis qu'en cas de fort stress environnemental, les plantes vont à l'inverse s'entraider (Le Bagousse-Pinguet et al., 2012 ; Bertness and Callaway, 1994).

### ***Les principaux groupes ectomycorhiziens en Nouvelle-Calédonie***

Les champignons ectomycorhiziens sont principalement représentés par les *Homobasidiomycetes* qui sont associés à environ 20 familles de plantes ligneuses (Ducousso et al., 2008).

L'inventaire des champignons en Nouvelle-Calédonie n'en est qu'à un stade très fragmentaire, à peine 1 % des espèces (300 sur 30 000 estimés) auraient été décrites à ce jour (Eyssartier et al., 2008). Depuis 2006, un programme de recherche sur le rôle des microorganismes symbiotiques, notamment les champignons, dans l'adaptation des plantes aux sols extrêmes et la création de la Société mycologique de Nouvelle-Calédonie en 2008 ([www.smnc.nc](http://www.smnc.nc)) ont permis l'identification de plusieurs centaines d'espèces nouvelles pour ce territoire, mais également la découverte de nouvelles espèces (e.g : Ducousso et al., 2009). Une partie de cette étude a permis d'établir une première liste d'espèces de champignons ectomycorhiziens (Ducousso and Hamir, 2010).

Il apparaît d'une étude de (Waseem et al., 2017) que des espèces végétales localement dominantes sur les sols ultrabasiques de Nouvelle-Calédonie (*Tristaniopsis* spp. et *Nothofagus* spp.) sont ectomycorhiziennes, avec la présence récurrente et diversifiée des partenaires symbiotiques de la famille des *Cortinariaceae*. Dans une autre étude (Waseem, 2011), la présence des genres ectomycorhiziens associés à *Tristaniopsis* spp. En Nouvelle-Calédonie en fonction du type de sol : ultrabasique ou volcano-sédimentaire, a permis de mettre en évidence comme genres les plus fréquents *Cortinarius*, *Pisolithus*, *Russula* et *Boletellus*.

### ***Etat de l'art de la restauration écologique des maquis minier en Nouvelle-Calédonie***

En Nouvelle-Calédonie, la restauration écologique des sites miniers pose la question de l'écosystème de référence à reproduire. En effet, lorsque le sol est toujours en place, on admet que l'écosystème de référence est celui des écosystèmes en place, sur des sols similaires et dans l'environnement proche. Dans ce cadre, une opération de restauration écologique a été initiée avec succès dans le parc provincial de la chute de la Madeleine (Cornu et al., 2001). D'autres opérations ont également été menées avec succès par le programme forêt sèche de l'IAC pour la restauration écologique de la forêt sèche



([http://www.biodiversite.nc/Le-programme-Foret-seche\\_a45.html](http://www.biodiversite.nc/Le-programme-Foret-seche_a45.html)). Dans ces cas : chute de la Madeleine et Forêt sèche, un sol, même dégradé était encore en place. Dans le cas d'une exploitation minière à ciel ouvert, lorsque le sol a été retiré mécaniquement jusqu'à la roche mère et qu'au mieux le site à restaurer est recouvert d'une mince couche (en général 30 cm) de stérile minier, la question de l'écosystème de référence reste entière. C'est pourquoi, beaucoup d'acteur de l'environnement minier préfère parler de réhabilitation des sites miniers. A la différence de la revégétalisation qui peut être limitée à la simple mise en place d'une espèce végétale qui couvre le terrain, certain parle de « reverdissement », la réhabilitation prend en compte les flux hydriques, l'érosion et également la durabilité de l'opération. En cela, la réhabilitation peut être considérée dans certain cas comme de la restauration écologique au sens de la définition de la International Society for Ecological Restoration ([www.ser.org](http://www.ser.org)) : le processus d'assistance à la récupération d'un écosystème dégradé, endommagé ou détruit. La lecture des sites web des principaux opérateurs miniers de Nouvelle-Calédonie permet de mesurer facilement leur intérêt pour la restauration écologique qui est illustré de chiffres : 471.239 plantes de 120 espèces toutes endémiques ont été produites, parmi elles, 75 espèces rares... Bien évidemment, ces plantes produites pour la restauration écologique sont destinées au transfert sur le terrain et là, avec une honnêteté qui mérite d'être soulignée, il est fait mention de « revégétalisation » et non plus de restauration écologique. A ce jour, en Nouvelle-Calédonie, nous ne connaissons pas d'opération de restauration écologique d'un site minier, opération aboutie et publiée. Nonobstant, Dans une publication à venir, le Professeur H. Amir a fait un état des lieux des différents essais de réhabilitation des sites miniers dégradés. Par les différentes plantations réalisées, il a pu remarquer, dans certaines plantations âgées d'*A.spirorbis*, l'apparition spontanée d'espèces endémiques très probablement issues des maquis adjacents. L'établissement spontané puis le développement de ces espèces va alors de pair avec la régression des *A. spirorbis* initialement plantés. Dans nos fréquents déplacements sur le terrain, nous avons pu observer une plantation d'*A. spirorbis* âgée de 17 ans où le développement spontané d'espèces endémiques typiques des maquis minier engendre le dépérissement d'*A. spirorbis* (Figure 3).



Figure 12: Plantation d'*A. spirorbis* âgée de 17 ans. A : Le développement de semis naturels dans l'environnement d'*A. spirorbis* est bien visible, notamment un *Gymnostoma deplancheanum* (Miq.) L.A.S. Johson ; B : en vue de détail, de nombreux semis d'espèces endémiques émergent de la litière : *Styphelia* sp. *Ghania aspera*, *Schoenus* sp., *Nepenthes novaecaledonica*, etc.

### Références bibliographiques

- Aronson, J., Clewell, A.F., Blignaut, J.N., and Milton, S.J. (2006). Ecological restoration : A new frontier for nature conservation and economics. *14*.
- Le Bagousse-Pinguet, Y., Liancourt, P., Gross, N., and Straile, D. (2012). Indirect facilitation promotes macrophyte survival and growth in freshwater ecosystems threatened by eutrophication. *J. Ecol.* *100*, 530–538.
- Bertness, M.D., and Callaway, R. (1994). Positive interactions in communities. *Trends Ecol. Evol.* *9*, 187–191.
- Bradford, M.D., and Schwab, E. (2013). Current Usage of Symbiosis and Associated Terminology. *Int. J. Biol.* *5*, 32–45.
- Brooker, R.W., Maestre, F.T., Callaway, R.M., Lortie, C.L., Cavieres, L.A., Kunstler, G., Liancourt, P., Tielbörger, K., Travis, J.M.J., Anthelme, F., et al. (2008). Facilitation in plant communities: The past, the present, and the future. *J. Ecol.* *96*, 18–34.

- Bruno, J.F., Stachowicz, J.J., and Bertness, M.D. (2003). Inclusion of facilitation into ecological theory. *Trends Ecol. Evol.* 18, 119–125.
- Callaway, R.M. (1995). Positive Interactions among Plants. *Bot. Rev.* 61, 306–349.
- Cázares, E., Trappe, J.M., and Jumpponen, A. (2005). Mycorrhiza-plant colonization patterns on a subalpine glacier forefront as a model system of primary succession. 405–416.
- Chopra, K., Leemans, R., Kumar, P., and Simons, H. (2005). Ecosystems and human well-being: Policy responses. The millennium ecosystem assessment series vol. 3 (Washington).
- Cornu Alain, Sarrailh Jean-Michel, Marion France, Langrand Olivier, Ndinga Assitou. 2001 Espèces endémiques et restauration écologique en Nouvelle-Calédonie. . *Bois et Forêts des Tropiques* (268) : 57-68.
- Ducousso, M., and Hamir, A. (2010). Les bactéries et les champignons du sol sur roches ultramafiques. In *Mines et Environnement de Nouvelle-Calédonie*, pp. 129–144.
- Ducousso, M., Ramanankierana, H., Duponnois, R., Rabévoitra, R., Randrihasipara, L., Vincelette, M., Dreyfus, B., and Prin, Y. (2008). Mycorrhizal status of native trees and shrubs from eastern Madagascar littoral forests with special emphasis on one new ectomycorrhizal endemic family, the Asteropeiaceae. *New Phytol.* 178, 233–238.
- Ducousso, M., Proust, S., Vigier, D., and Eyssartier, G. (2009). *Podoserpula miranda*. *Bois Forêts Des Trop.* 302, 73–75.
- Eriksson, O., and Ehrlén, J. (2001). Landscape fragmentation and the viability of plant populations. In *Integrating Ecology and Evolution in a Spatial Context.*, pp. 157–175.
- Eyssartier, G., Ducousso, M., and Buyck, B. (2008). Agaricales nouveaux ou intéressants de Nouvelle-Calédonie. *Cryptogam. Mycol.* 30, 329–339.
- Horton, T.R., Bruns, T.D., and Parker, V.T. (1999). Ectomycorrhizal fungi associated with *Arctostaphylos* contribute to *Pseudotsuga menziesii* establishment. *Can. J. Bot.* 77, 93–102.

- Jourand, P., Ducousso, M., Reid, R., Majorel, C., Richert, C., Riss, J., and Lebrun, M. (2010). Nickel-tolerant ectomycorrhizal *Pisolithus albus* ultramafic ecotype isolated from nickel mines in New Caledonia strongly enhance growth of the host plant *Eucalyptus globulus* at toxic nickel concentrations. *Tree Physiol.* *30*, 1311–1319.
- L’Huillier, L., Wulff, A., Gâteblé, G., Fogliani, B., Zongo, C., and Jaffré, T. (2010). La restauration des sites miniers. In *Mines et Environnement de Nouvelle-Calédonie*, pp. 147–230.
- Padilla, F.M., and Pugnaire, F.I. (2006). The role of nurse plants in the restoration of degraded environments. *Front. Ecol. Environ.* *4*, 196–202.
- Remy, W., Taylor, T.N., Hass, H., and Kerp, H. (1994). Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Plant Biol.* *91*, 11841–11843.
- Richard, F., Selosse, M.A., and Gardes, M. (2009). Facilitated establishment of *Quercus ilex* in shrub-dominated communities within a Mediterranean ecosystem: Do mycorrhizal partners matter? *FEMS Microbiol. Ecol.* *68*, 14–24.
- Selosse, M.-A., Baudoin, E., and Vandenkoornhuyse, P. (2004). Symbiotic microorganisms , a key for ecological success and protection of plants. *C.R. Biol.* *327*, 639–648.
- Selosse, M.A., Richard, F., He, X., and Simard, S.W. (2006). Mycorrhizal networks : des liaisons dangereuses ? *TRENDS Ecol. Evol.* *21*, 621–628.
- Simard, S.W., Beiler, K.J., Bingham, M.A., Deslippe, J.R., Philip, L.J., and Teste, F.P. (2012). Mycorrhizal networks : Mechanisms , ecology and modelling. *Br. Mycol. Soc.* *26*, 39–60.
- Smith, M.E., and Read, D. (2008). *Mycorrhizal symbiosis*, 3rd edition. (London).
- Stachowicz, J.J. (2001). Mutualism, Facilitation, and the Structure of Ecological Communities. *Bioscience* *51*, 235–246.
- Tansley, A.G. (1935). The Use and Abuse of Vegetational Concepts and Terms. *Ecol. Soc. Am.* *16*, 284–307.

- Wali, M.K. (1999). Ecological succession and the rehabilitation of disturbed terrestrial ecosystems. *Plant Soil* 213, 195–220.
- Wang, B., and Qiu, Y.L. (2006). Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* 16, 299–363.
- Waseem, M. (2011). Biodiversité et stratégies adaptatives des bactéries mycorrhizosphériques associées à *Tristaniopsis* dans les écosystèmes ultramafiques de Nouvelle-Calédonie.
- Waseem, M., Ducouso, M., Prin, Y., Domergue, O., Hannibal, L., Majorel, C., Jourand, P., and Galiana, A. (2017). Ectomycorrhizal fungal diversity associated with endemic *Tristaniopsis* spp. (Myrtaceae) in ultramafic and volcano-sedimentary soils in New Caledonia. *Mycorrhiza*.



# Chapitre 1

Etude de la diversité ectomycorhizienne associée

à *Acacia spirorbis* sur des sols contrastés de Nouvelle-Calédonie





## Introduction du Chapitre 1

### Objectif :

Afin de déterminer d'éventuelles variations de la diversité des partenaires fongiques de la symbiose ectomycorhizienne d'*A. spirorbis* et une possible préférence écologique en fonction des contraintes géochimiques des sols de Nouvelle-Calédonie, un inventaire des ectomycorhizes a été réalisé sur une variété de sols contrastés de Nouvelle-Calédonie. Ces sols ont été regroupés en trois grandes classes : ferrallitiques, volcano-sédimentaires et calcaires. Cette étude est réalisée dans le but de définir si *A. spirorbis* peut être utilisé en restauration écologique pour ses capacités à mettre en place des conditions favorables à l'implantation d'une succession végétale assistée.

### Résultats principaux :

Ce chapitre fait l'objet d'un article accepté pour publication dans la revue *Microbial Ecology*.

Dans ce premier article, nous mettons en évidence la capacité d'*A. spirorbis* à pousser dans une variété de sols aux caractéristiques très différentes et, dans tous ces types de sols, sa capacité à former des ectomycorhizes avec une large diversité de champignons. La diversité ectomycorhizienne n'apparaît pas impactée sur les sols ferrallitiques réputés contraignants, elle est même légèrement plus diversifiée. Il apparaît également que la diversité ectomycorhizienne est nettement plus restreinte et spécifique sur les sols calcaires et dominée par deux lineages seulement : les *Thelephoraceae* et les *Sebacina*. Sur toutes les classes de sol, le lineage des *Thelephoraceae* est prédominant.

### Conséquences pour l'itinéraire technique :

Ces résultats nous permettent d'envisager l'utilisation d'*A. spirorbis* en restauration écologique des sites miniers dégradés qui sont des sols ferrallitiques appauvris. Cette utilisation serait focalisée sur la réintroduction de champignons ectomycorhiziens afin de recréer des topsoils riches en microorganismes et induire un effet de facilitation avec des espèces cibles. Ainsi utilisée comme plante facilitatrice, *A.*

*spirobis* pourrait transférer ses ectomycorhizes à des espèces cibles plantées à proximité, améliorer leur développement et ainsi augmenter les chances de réussite d'une opération de restauration écologique d'un site minier dégradé.

**Article 1: Ectomycorrhizal communities associated with the legume *Acacia spirorbis* growing on contrasted edaphic constraints in New Caledonia**

**Authors:** Anne HOULES<sup>1,2</sup>, Bryan VINCENT<sup>3</sup>, Magali DAVID<sup>4</sup>, Marc DUCOUSSO<sup>\*1</sup>, Antoine GALIANA<sup>1</sup>, Farid JUILLOT<sup>4</sup>, Laure HANNIBAL<sup>3</sup>, Fabian CARRICONDE<sup>5</sup>, Emmanuel FRITSCH<sup>4</sup> and Philippe JOURAND<sup>3</sup>

**Author's affiliations**

<sup>1</sup>CIRAD, UMR082 LSTM, F-34398 Cedex 5, Montpellier, France

<sup>2</sup>Koniambo Nickel SAS, Vavouto, BP 679, 98860 Koné, New Caledonia

<sup>3</sup>IRD, UMR040 LSTM, NC-98848 Nouméa Cedex, New Caledonia

<sup>4</sup>IRD, UMR206 IMPMC, NC-98848 Nouméa Cedex, New Caledonia

<sup>5</sup>Institut Agronomique néo-Calédonien (IAC), Axe 2, 98800 Nouméa, New Caledonia

**\*Corresponding author mailing address**

CIRAD-LSTM, TA A-82/J, Campus International de Baillarguet F-34398 Cedex 5, Montpellier, France. Phone: +33 (0)782016106

E-mail: marc.ducousso@cirad.fr

## **Abstract**

This study aims to characterize the ectomycorrhizal (ECM) communities associated with *Acacia spirorbis*, a legume tree widely spread in New Caledonia that spontaneously grows on contrasted edaphic constraints, i.e. calcareous, ferrallitic and volcano-sedimentary soils. Soil geochemical parameters and diversity of ECM communities were assessed in twelve sites representative of the three main categories of soils. The ectomycorrhizal status of *Acacia spirorbis* was confirmed in all studied soils, with a fungal community dominated at 92 % by Basidiomycota, mostly represented by *Tomentella-thelephora* (27.6 %), *Boletus* (15.8 %), *Sebacina* (10.5 %), *Russula-lactarius* (10.5 %), *Pisolithus-scleroderma* (7.9 %) lineages. The diversity and the proportion of the ECM lineages were similar for the ferrallitic and volcano-sedimentary soils, but significantly different for the calcareous soils. These differences in the distribution of the ECM communities were statistically correlated with pH, Ca, P and Al in the calcareous soils and with Co in the ferrallitic soils. *Acacia spirorbis* forms ECM symbioses with a large spectrum of fungi of which distribution is correlated with soil categories and edaphic parameters. This suggests that fungi already established in a site might play a significant role in the ability of *A. spirorbis* at colonizing this site and thus soils with contrasted edaphic constraints.

**Keywords:** *Acacia spirorbis*, Ectomycorrhizas, New Caledonia, Fungal diversity, Edaphic constraint

## Introduction

New Caledonia is a tropical archipelago located in the southwest Pacific, about 1,200 kilometres east from Australia. Because of a contrasted geological history, New Caledonia presents a wide variety of soils that can be grouped into three major categories: clayey and chert soils developed upon volcano-sedimentary rocks (basalts, schists and chert-type siliceous sediments) that cover about 2/3 of the main island, ferralitic soils developed upon ultramafic rocks (peridotites and serpentinites) representing about 1/3 of the main island, and more or less humic and aluminous soils developed upon coral reef formations that are mainly found in the Loyalty islands [1]. This diversity of soils, combined with the tropical climatic conditions and the geographical isolation of the archipelago, led to the high terrestrial biodiversity of the island i.e. 3,371 vascular plant species among which 80 % are endemic [2]. This terrestrial biodiversity is currently threatened by anthropogenic activities that contribute to make the New Caledonian archipelago one of the world biodiversity hotspots [3, 4]. Among the vascular plants identified in New Caledonia, [5] reported *Acacia spirorbis* which belongs to the Fabaceae family and the Mimosoideae subfamily. This legume named *Acacia spirorbis* subsp. *spirorbis*, abbreviated into *A. spirorbis* along the following text, is now considered as a species of the phyllodinous Australian acacias clade and is geographically located only in the New Caledonian archipelago [6]. This legume species has the capacity to develop a triple root symbiosis with the nitrogen fixing bacteria *Bradyrhizobium* sp. [7] and with both arbuscular (AM) and ectomycorrhizal (ECM) fungi [8, 9]. *Acacia spirorbis* is able to colonize and grow on a large variety of soils (i.e. calcareous in the Loyalty islands, volcano-sedimentary and ferralitic soils on the main island that show a large range of concentrations of major plant nutrients (Ca, N, P and K) and high levels of potentially toxic heavy metals (Co, Cr, Mn and Ni) as well as pH values between 4 and 8). This plant is naturally widespread in New Caledonia, with a large distribution along the archipelago up to an altitude of 400 meters, and it was used as a tool in ecological restoration strategies for ferralitic outcrops after nickel mining [10]. In a previous study it has been shown that *A. spirorbis* was able to form ECM symbiosis with the fungus *Pisolithus albus* in soils developed upon volcano-sedimentary or ultramafic rocks [11]. It has also been recently demonstrated that the ECM fungus *P. albus* plays a key role in adaptation of *A. spirorbis* to ferralitic soils, by enhancing the uptake

of major nutritive elements such as Ca, K and P and reducing the polymetallic toxicity related to the large amounts of cobalt, chromium, manganese and nickel naturally present in most ferralitic soils [9]. Such adaptations of *A. spirorbis* related to its ability to develop symbiotic association with a specific ECM fungus raises the question of the actual diversity of the ECM fungal community associated with this plant species, in relation with the various edaphic conditions encountered by this legume. Very few studies have reported comparisons between ECM fungal communities of a same tree species facing different edaphic constraints, mainly because the distribution of most ECM tree species is limited by soil constraints. For example, a study focused on *Quercus* spp. that is able to grow on both ferralitic and non-ferralitic soils reported similar structures of ECM communities associated with this plant in both soil types [12]. Similarly, the comparison of fungal ECM communities from plants growing on both serpentine and non-serpentine soils concluded that the serpentinic edaphic constraints did not limit but might even promote the ECM diversity [13, 14]. However, it is often assumed that links exist between (i) the distribution of tropical tree diversity, (ii) the distribution of tropical ectomycorrhizal diversity and (iii) the local-scale edaphic variations [15]. More recently, Roy et al [16] found that the richness of the ECM community associated with *Alnus* spp. was significantly influenced by soil parameters (mineral vs organic), with about 26 % of richness variation that could be explained by the soil parameters in combination with the host plant of origin. This latter result is in agreement with the conclusion of the recent review article by Tedersoo et al [17] indicating that environmental traits such as climatic and edaphic conditions strongly structure the fungal biodiversity at the global scale. In New Caledonia, the contrasted edaphic conditions might also structure the diversity of the ECM fungal communities encountered by the legume *A. spirorbis* that is able to colonize a large variety of soils.

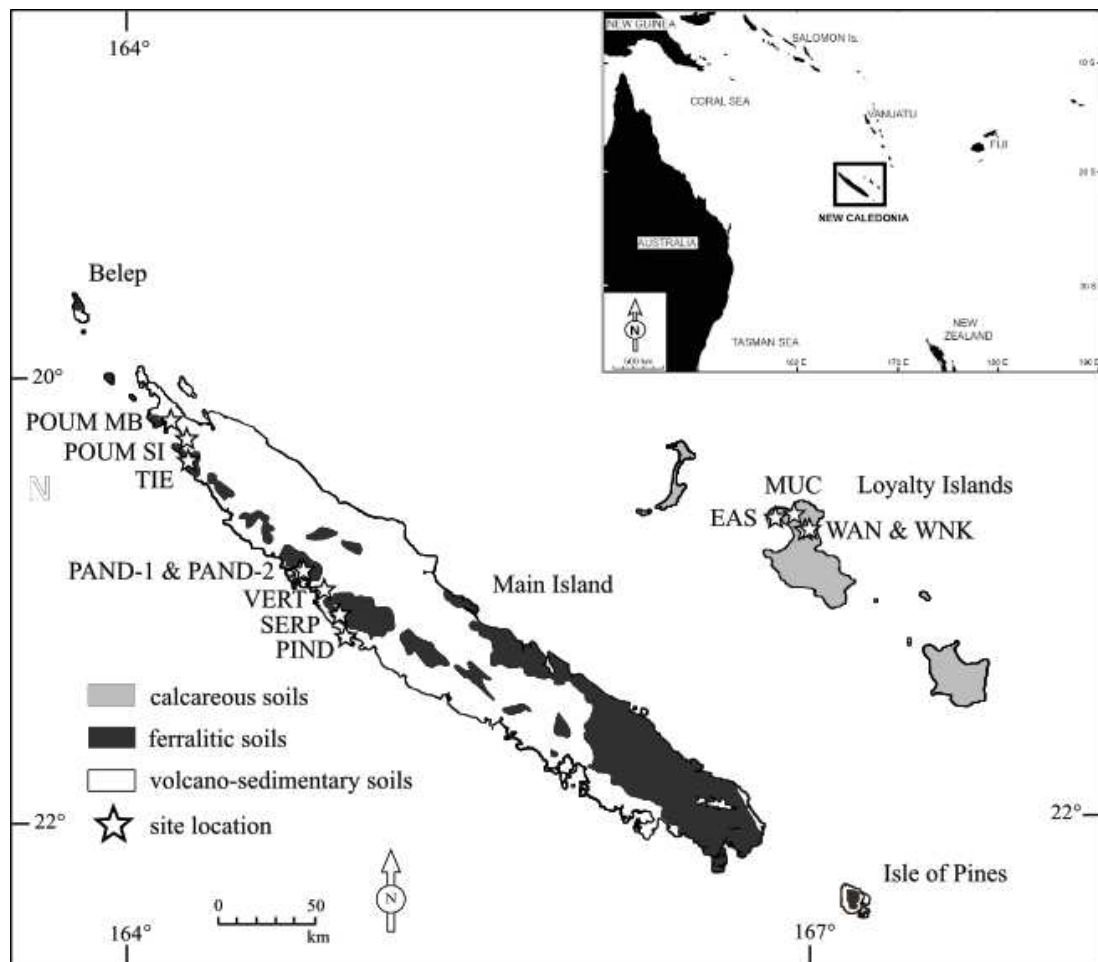
The aims of the present study were (i) to characterize the general ECM status of *A. spirorbis* on the different soil types on which this plant species spontaneously grows, (ii) to analyse the structure of the ECM fungal communities able to develop spontaneous symbiotic associations with this legume species *in situ*, and (iii) to compare the structures of ECM communities of the three soil categories. The hypothesis is that *A. spirorbis* has a strong capacity to develop ECM symbiosis regardless of the diversity of *in situ* fungal communities. In order to perform this study, the diversity of the ECM fungal community associated with *A. spirorbis* naturally growing on the three major types of soils in New

Caledonia i.e. soils developed upon calcareous, ultramafic and volcano-sedimentary rocks, was assessed. For that purpose, ECM root tips of *A. spirorbis* were sampled in several sites representative of the three major soil types for identification and molecular characterization of symbiotic partners by ITS sequencing. The resulting ECM fungal diversity associated with *A. spirorbis* was established and then analysed according to the soil type.

## **Materials and methods**

### ***Site description, soil sampling and chemical analyses***

The sites for sampling were chosen as they all presented gregarious populations of *A. spirorbis*. The geographical position of the sites where the soil samples and ECM roots from *A. spirorbis* were collected are shown on the map in Figure 1, and the detailed location of the study sites and soil descriptions are reported in Table 1 [18]. These soils were classified into three major categories as recently reported in the pedological survey of New Caledonia by Fritsch [1]. Four soils were classified into the calcareous (CA) soil category: two Gibbsic Ferralsols, Humic (WNK and MUC), one Gibbsic Ferralsols, Magnesic (WAN) and one Rendzic Leptosol, Humic (EAS). Four soils were classified into the ferralitic (FE) soil category: one Geric Plinthosol (TIE), one Magnesic Ferralsol (PAND-1), one Abruptic Ferralsol (PAND-2) and one Haplic Ferralsol (PIND). Four soils were classified into the volcano-sedimentary (VS) soil category: one Leptic Cambisol (POUM MB), one Albic Acrisol (POUM SI), one Haplic Vertisol (VERT) and one Haplic Cambisol (SERP). For each of these twelve soils, three samples of 1 litre each representing the 0-30 cm horizon were collected. This depth was considered as representative of the bulk soil horizon that is mainly explored by the *A. spirorbis* roots.



**Figure 1:** Map of the New Caledonian archipelago including the 3 major soil categories (i.e. calcareous, ferrallitic and volcano-sedimentary soils) and showing the location of the sites where ectomycorrhizal fungi were sampled from roots of *Acacia spirorbis*.



**Table 1:** Summary data of sampled sites where ectomycorrhizas of *A. spirorbis* were collected: description, references as reported in Figure1, location with geographical coordinates and soil description and WRB classification as reported by Fritsch [1].

Soil geochemical category	Site name	Location and coordinates	Soil description and WRB classification
Calcareous	<b>EAS</b>	Atoll's ledge, Pointe of Easo (Lifou) S 20°47'12.23''; E 167°07'21.72'' (alt 25 m)	Very thin dark-brown humic soil Rendzic Leptosol (Humic)
	<b>MUC</b>	Atoll's central plateau, Mucaweng (Lifou) S 20°44'57.54''; E 167°09'09.34'' (alt 40 m)	Thin dark yellow-brown soil Gibbsic Ferralsol (Humic)
	<b>WAN</b>	Atoll's central plateau, Wanaham (Lifou) S 20°44'43.56''; E 167°13'17.88'' (alt 31 m)	Thin yellow-brown soil Gibbsic Ferralsol (Magnesic)
Ferralitic	<b>WNK</b>	Atoll's central plateau, Wanek (Lifou). S 20°44'49.33''; E 167°05'00.86'' (alt 41m)	Red-brown soil with calcareous rocks Gibbsic Ferralsol (Humic)
	<b>TIE</b>	Colluvium at the bottom of the Tiebaghi ultramafic regolith S 20°28'19.20''; E 164°15'35.16'' (alt 69 m)	Red pisolithic soil Geric Plinthosol
	<b>PIND</b>	Pindaï peninsula, East Nepoui S 21°19'55.45'' E 164°58'19.24'' (alt 65 m)	Red-brown soil Haplic Ferralsol
Volcano sedimentary	<b>PAND-1</b>	Bottom of the Koniambo ultramafic regolith S 21°01'35.84''; E 164°46'58.68'' (alt 38 m)	Brown soil Magnesic Ferralsol
	<b>PAND-2</b>	Colluvium of pisolithic material (Pandanus valley) S 21°01'58.80''; E 164°46'40.97'' (alt 31 m)	Brown clayey soil with colluvium pisolithic cover Abruptic Ferralsol
	<b>POUM</b>	Golone peninsula, Poum Malabou S 20°17'32.56''; E 164°05'22.60'' (alt 48 m)	Brown gravel-rich soil Leptic Cambisol
	<b>SI</b>	Podzols beach (Poum) S 20°13'38.50''; E 164°04'44.52'' (alt 14 m)	Silicic bleached soil Geric Acrisol (Albic)
	<b>VERT</b>	Black soils plain on basalts, Pouembout S 21°07'59.59''; E 164°54'55.64'' (alt 16 m)	Black yey soil Haplic Vertisol
	<b>SERP</b>	Serpentinic basement of the Tia plateau ultramafic regolith S 21°10'27.74''; E 164°52'40.47'' (alt 75 m)	Thin silty grey-brown soil (can be gravel-rich) Haplic Cambisol

Abbreviation: alt: altitude; WRB: world reference base for soil resources [18]

The concentration of elements (Si, Mg, Ca, Na, K, P, Fe, Mn, Al, Ni, Cr, Co, P) in the soil samples was determined at the ISO 9002 certified Laboratoire des Moyens Analytiques (LAMA) of the Centre IRD de Noumea (New Caledonia) by ICP-AES after alkaline fusion [19]. The organic carbon (Corg) and nitrogen (Norg) contents were determined following the Walkley-Black and Kjeldahl methods, respectively, as previously described in [19]. The full geochemical characteristics of the twelve soils sampled are reported in ESM Table 1A, B and C and data are summarized in Table 2. For pH and each element soil content, a non-parametric test of Kruskal-Wallis was applied to detect possible differences between soil types. When the Kruskal-Wallis p value test was  $< 0.05$ , a pairwise Wilcoxon test was used to assess the different levels of significance at  $p < 0.05$ . The letters a, b and c indicate these levels respectively from the best to the lowest (Table 2).

The geochemical data of each site were analysed by a principal component analysis (PCA) in order to test the pooling of the sites according to their geochemical properties. All statistical analyses were carried out using the *R* software (<https://www.r-project.org/>) as described below.

**Table 2:** Geochemical characteristics of the bulk soils. All data are means  $\pm$  stdv of element content measured in soil samples gathering data of soil sites belonging to a same soil category. For pH and each soil element, a non-parametric test of Kruskal-Wallis was applied to detect differences between soil types of which p value is reported. When Kruskal-Wallis p value test was  $< 0.05$ , a pairwise Wilcoxon test was used to assess the different levels of significance that letters a, b or c indicate at  $p < 0.05$ .

Geochemical characteristics	Soil type according to the geochemical soil analyses			Kruskall wallis	
	Calcareous	Ferrallitic	Volcano-sedimentary	Statistic test	
pH	7.6 ± 0.8 a	6.1 ± 0.5 b	5.7 ± 1.1 b	9.99 e-05	
Total element soil contents (mg/kg)	C	7,420 ± 3,521 a	2,322 ± 2,004 b	2,858 ± 2,627 b	0.007362
	N	5,500 ± 4,845 a	999 ± 780 b	1,006 ± 923 b	0.003292
	P	6,471 ± 2,662 a	81 ± 59 b	168 ± 180 b	7.376 e-05
	K	267 ± 124	336 ± 469	2,807 ± 3,222	0.459
	Ca	78,585 ± 81,909 a	1,443 ± 1,968 b	13,035 ± 20,923 b	0.0004076
	Mg	23,234 ± 34,731	29,087 ± 41,762	21,199 ± 20.005	0.8723
	Na	585 ± 475 b	352 ± 194 b	4,017 ± 4,825 a	0.02781
	Al	141,574 ± 75,691 a	29,079 ± 19.879 b	49,952 ± 37,457 b	0.004413
	Fe	109,749 ± 58,963 b	317,453 ± 137,596 a	46,231 ± 35,582 c	9.068 e-05
	Co	43 ± 26 b	608 ± 295 a	45 ± 39 b	8.324 e-05
	Cr	570 ± 233 b	20,833 ± 9,919 a	569 ± 581 b	5.713 e-05
	Mn	3,103 ± 1,768 a	7,714 ± 6,942 a	668 ± 516 b	0.0001502
	Ni	44 ± 20 b	5,653 ± 2,783 a	524 ± 772 b	5.436 e-05
	Si	13,420 ± 10,698 c	100,194 ± 57,151 b	301,606 ± 97,483 a	2.669 e-06

### *Sampling of ectomycorrhizal root tips*

In each selected site, ectomycorrhizal root tips were collected from roots of *A. spirorbis* specimens in dense populations, aged from 2 to 15 years and dispersed across an area of about 1 hectare. Ectomycorrhizas were randomly collected on five trees per site, with a minimal distance of 10 meters between each specimen. For each tree, ectomycorrhizas were collected using the root tracking method

that consists in following the roots from the largest trunk-connected roots toward the finest ones where ectomycorrhizas preferentially occur [19]. Numbers of ECM collected on each site are reported in Table 3. Immediately after sampling, the ectomycorrhizal root tips were placed in sealed vials and directly transferred into liquid nitrogen. Back to the laboratory, the samples were stored at -20°C before DNA extraction for sequencing.

**Table 3:** Summary of ECM data collected on roots of *A. spirorbis* in the 12 studied sites: number of ECM collected, ITS DNA sequences obtained with their accession number as deposited in DDJB bank, the corresponding number of OTU generated and the observed Shannon  $H'$  and Simpson  $D$  diversity indexes per site.

Soil geochemical category	Site name	Total number of ECM root tips sampled	Number of DNA ITS sequences obtained	ITS DNA sequence accession number in DDJB bank	Number of OTU at 97% represented	Diversity indexes Observed	
						Shannon $H'$	Simpson $D$
Calcareous	<b>EAS</b>	49	25	LC122057 to LC122081	11	2.20	0.09
	<b>MUC</b>	8	5	LC122082 to LC122086	4	1.33	0.10
	<b>WAN</b>	43	19	LC122241 to LC122259	8	1.84	0.15
	<b>WNK</b>	8	5	LC122260 to LC122264	4	1.33	0.10
Ferrallitic	<b>TIE</b>	62	12	LC122200 to LC122211	8	2.27	0.06
	<b>PIND</b>	33	16	LC122116 to LC122131	11	2.45	0.11
	<b>PAND-1</b>	21	13	LC122087 to LC122099	7	2.35	0.03
	<b>PAND-2</b>	48	16	LC122100 to LC122115	13	1.77	0.17
Volcano sedimentary	<b>POUM MB</b>	77	41	LC122132 to LC122172	18	1.35	0.24
	<b>POUM SI</b>	46	12	LC122173 to LC122184	5	2.15	0.11
	<b>VERT</b>	55	29	LC122212 to LC122240	11	1.92	0.11
	<b>SERP</b>	38	15	LC122185 to LC122199	8	1.94	0.09
<b>Global sampling</b>		<b>488</b>	<b>208</b>		<b>76</b>	<b>2.15</b>	<b>0.11</b>

Abbreviations: ITS: internal transcribed spacer; OTU: operational taxonomic unit; DDJB: DNA Data Bank of Japan

### ***Molecular methods***

Total DNA was extracted from individual ectomycorrhizal root tips using the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Courtabœuf, France) following the protocol described by Jourand et al [11]. A fragment of ribosomal DNA of approximately 650 bp of the Internal Transcribed Spacer regions (ITS) was amplified using primers ITS1F: 5'-TTTCCGTAGGTGAACCT-3' [20] and ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' [21]. The PCR reaction used for this amplification was prepared in a total volume of 25 µL containing a 1 µL aliquot of genomic DNA diluted to 1/20, 1 µM of each primer, 1.5 units of Taq DNA polymerase (Promega, Charbonnières, France), 5 µL of 5X Promega Taq polymerase buffer, 2 mM of MgCl<sub>2</sub> and 200 µM of dNTP Promega. Amplification was performed with a Mastercycler ® thermocycler Eppendorf (Eppendorf, Hamburg, Germany) programmed as follows: one cycle of 3 min at 94°C, followed by 35 cycles of 45 s at 94°C, 45 s at 55°C, 1 min at 72°C and a final extension of 10 min at 72°C. PCR products were checked by electrophoresis on a 1 % agarose gel (Sigma) in 0.5 % TBE buffer with 2 µL ethidium bromide (BET, 10 µg/mL for 100 mL gel). A size marker 1,000 pb (Promega) was used to estimate the weight of the different fragments. The DNA bands were then visualized by fluorescence under UV light and photographed. Samples with simple and well-defined bands were then sequenced with primers ITS4 and ITS1F by the Macrogen Company (Macrogen, Seoul, Korea) using a genetic analysis based on capillary electrophoresis ABI3730.

### ***Data and statistical analyses***

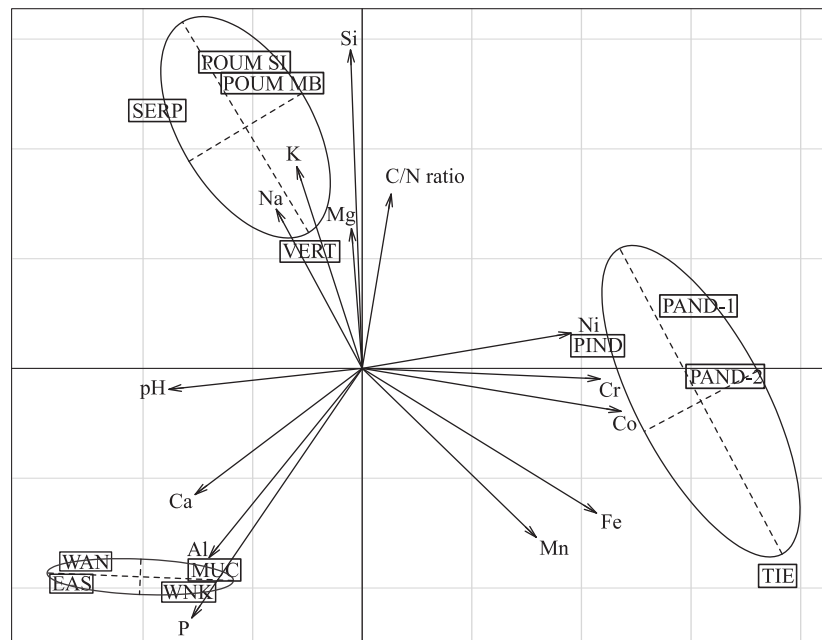
The molecular data were analysed as follow: the ITS1F and ITS4 sequences were analysed and assembled into contigs with the Sequencher ® software (Genes code Corporation, Ann Harbor, Michigan, USA). The algorithm ITSx PlutoF Unite was used to remove the parts of 18S and 28S regions and keep the highly variable sub-regions [22]. The total DNA sequences were assigned to operational taxonomic units (OTU) using a 97 % sequence similarity cut off homology of the ITS sequences, as reported in Smith et al [23] by using the software CD-Hit Est® [24]. The fungal phylogenetic lineages were assigned using the MassBLASTer algorithm and then identified in reference to the PlutoF Unite

fungal database [21] following the fungal nomenclature reported by Tedersoo et al [25]. The level of diversity for each site was evaluated by calculation of the observed Shannon  $H'$  and Simpson  $D$  indexes [26]. In addition, the estimated and asymptotic richness index  $^{\circ}D$ , which counts species equally without regarding their relative abundance, Shannon diversity index  $^1D$ , which counts species in proportion to their abundance, and the Simpson diversity index  $^2D$ , which discounts all but the dominant species in the assemblage, were calculated using the *R* package of iNEXT [27]. To test the sampling method, the observed and estimated richness sample completeness curves were constructed using the iNEXT online software ([http://chao.stat.nthu.edu.tw/wordpress/software\\_download/](http://chao.stat.nthu.edu.tw/wordpress/software_download/); [28]. A Chi square independence test and dissimilarity Jaccard indices was applied to compare the distribution of ECM lineages between soil types. Correlations between the diversity of ECM lineages distribution among soils and their edaphic parameters were calculated after transformation of the geochemical characteristics of the soils into an Euclidian matrix and the conversion of the lineage repartition and distribution OTUs per sites reflecting the diversity of ECM communities into a Bray-Curtis dissimilarity matrix using abundance data [29]. A non-parametric Mantel test was then performed in order to check potential correlations between the Bray-Curtis and the Euclidian matrices. The ECM distribution including the edaphic parameters is represented with a non-metric dimensional scaling (NMDS) analysis. Permanova tests were carried out with the ADONIS function included in the Vegan *R* package to test the influence of the edaphic parameters on the ECM distribution. As the statistical analyses based on the Bray Curtis matrices generated by the dataset of OTU with and without singletons were very similar, only non-singleton OTUs were used in the NMDS analyses because the dataset may be influenced by low sampling that can yield misleading inferences about composition. All statistical analyses were carried out using the packages Vegan 2.0-6, RVAideMemoire 0.9-54 and Inext *R*, all in *R* 2.15.1 software [30].

## Results

### *Soil properties*

The geochemical characteristics per soil category (i.e. calcareous, ferralitic and volcano-sedimentary soils) are summarized in Table 2 and the whole data per site are reported in ESM Tables 1A, B and C. For pH and most of the element soil contents, the non-parametric test of Kruskal-Wallis showed significant differences between soil types ( $p < 0.05$ ) as reported in Table 2. The results of a principal component analysis (PCA) of the soil geochemical characteristics (including total element contents and pH) are shown in Figure 2.



**Figure 2:** Principal component analysis of the pH, the C/N ratio and the total element contents in the studied soils. Abbreviations: CA: calcareous soils; FE: ferralitic soils; VS: volcano sedimentary soils.

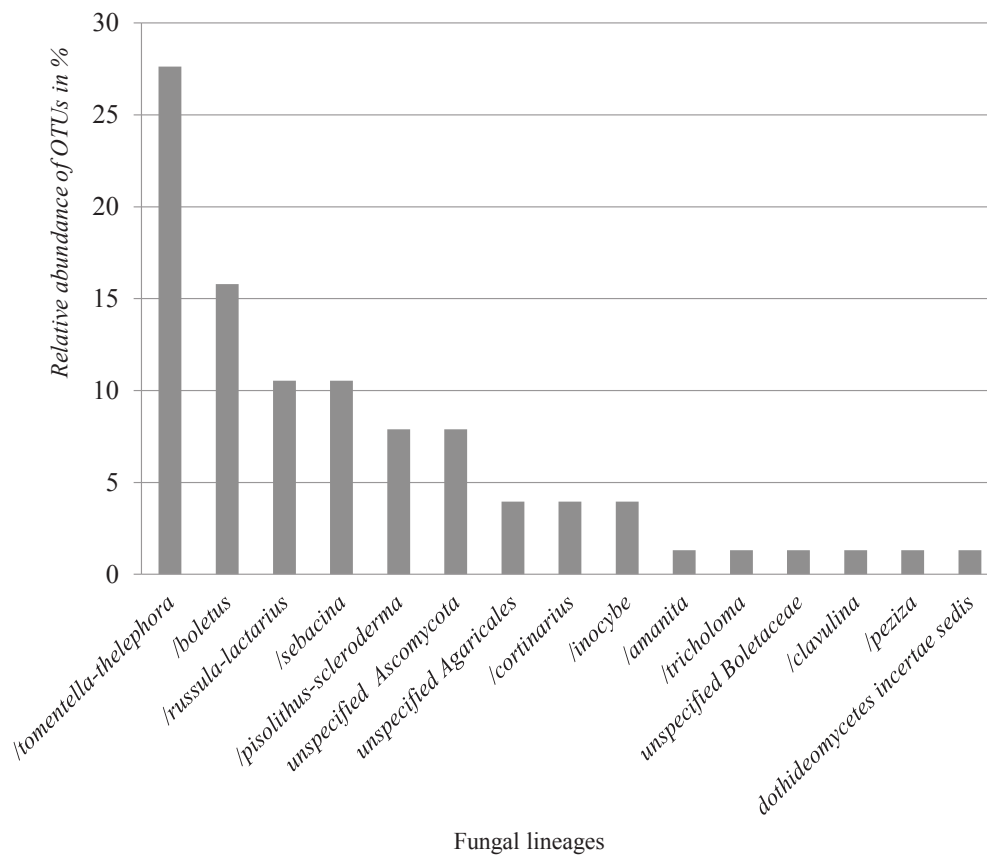
These results confirmed that the selected sites could be distributed into three main groups according to the soil geochemical characteristics: sites EAS, MUC, WAN and WNK can be grouped as calcareous soils (CA-soils); sites PAND-1, PAND-2, PIND and TIE can be grouped as ferralitic soils (FE-soils) and sites POUM SI, POUM MB, SERP and VERT can be grouped as volcano-sedimentary soils (VS-soils). The results of the statistical analyses (Table 2) indicated that CA-soils were mainly characterized

by significantly high levels of major plant nutrients (i.e. C, N and P) and also a high Ca/Mg ratio (3/1), while FE- and VS- soils had low contents in C, N and P and presented a strongly unbalanced Ca/Mg ratio (1/1.6 in VS-soils to 1/20 in Fe-soils). VS-soils were characterized by significantly high contents of Na and Si. Regarding potentially toxic elements, CA-soils were characterized by significantly high contents of Al, while VS-soils presented quite low levels of Fe and Mn. Finally, FE-soils differed significantly from the two other categories of soils, with very high Fe content, and also high contents in potentially toxic heavy metals: Co, Cr, Mn and Ni.

#### ***Diversity and richness of ECM fungi communities associated with A. spirorbis***

All the ITS DNA sequences obtained in this study were deposited in the DNA Data Bank of Japan (DDJB) from the accession numbers LC122057 to LC122264. Summary data concerning ITS sequences repartition in the studied sites are presented in Table 3. Full data presenting DDJB sequence accession numbers, OTU and Blast results with both genus and lineage identifications are available in ESM Table 2. As reported in Table 3, a total of 488 mycorrhizal root tips were collected from 60 *A. spirorbis* trees distributed throughout twelve selected sites and three soil categories. Successful ITS sequences were obtained from 208 ECM root tips and grouped into 76 different identified OTUs (including 41 singletons) corresponding to fungal lineages identified by Blast (ESM Table 2). Our results indicated that the majority of ECM taxa found in association with *A. spirorbis* belonged to the Basidiomycota division (92% of the total number of OTUs). The relative abundance of the 208 sequences according to the 76 identified OTUs and their distribution into 15 lineages, as presented in Figure 3, showed that the most representative Basidiomycota ECM taxa found belonged to the */tomentella-thelephora* (27.6 %), */boletus* (15.8 %), */sebacina* (10.5 %), */russula-lactarius* (10.5 %), */pisolithus-scleroderma* (7.9 %) lineages.



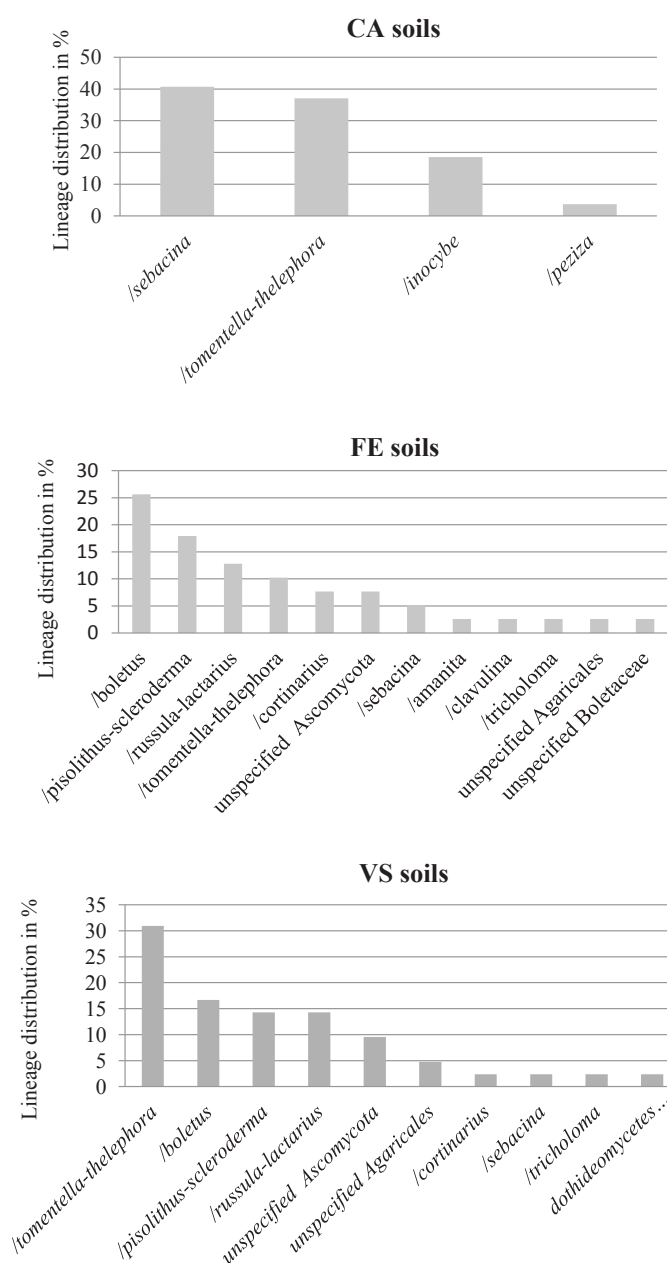


**Figure 3:** Distribution of the OTUs relative abundance (%) according to fungal lineages [25].

The rarefaction curves in ESM Figure 1 build with observed and estimated sample coverage validates the quality of our sampling. For calcareous and volcano-sedimentary sites the sample coverage reach approximately 90 % and 80 % of sample coverage observed, and for the ferralitic sites approximately 55 %. The estimated sample coverage indicates that by doubling this sampling, the sample coverage for calcareous and ferralitic sites change by less than 5 % and for ferralitic sites the sample coverage reaches 60 %.

### ***Relationship between ECM communities and edaphic conditions of soil categories***

The distribution of OTUs into lineages according to the three soil categories yielded contrasted features (Figure 4).



**Figure 4:** Distribution of the lineages according the three categories of soils : CA : calcareous ; FE : ferralitic ; VS : volcano-sedimentary.

In CA-soils, three Basidiomycota ECM lineages reached 96.2 % of the total number of OTUs identified, namely */sebacina* (41 %), */tomentella-thelephora* (37 %) and */inocybe* (18 %). In FE-soils, 11 Basidiomycota ECM lineages amounted to 92.4% of the OTUs, the most represented ones being */botelus* (25 %), */pisolithus-scleroderma* (17.9 %), */russula-lactarius* (12.8 %), */tomentella-thelephora* (10.2 %) and */cortinarius* (7.7 %). In VS-soils, eight Basidiomycota ECM lineages reached 88.1 % of the OTUs, mostly represented by */tomentella-thelephora* (31 %), */botelus* (16.7 %), */pisolithus-scleroderma* (14.3 %) and */russula-lactarius* (14.3 %). The distribution of the OTUs relative abundance according to both fungal lineages and soil categories is reported in ESM Figure 2.

The chi-square independence statistical test confirmed that the lineages distribution found in CA-soils was significantly different from those found in FE-soils (chi-square = 74.3, df = 28, p value = 4.5e-06 < 0.05) and in VS-soils (chi-square = 47.2, df = 13, p value = 9.0e-06 < 0.05). However, no significant differences were observed in the lineages distribution found in FE-soils and VS-soils (chi-square = 11.2, df = 12, p value = 0.5139 > 0.05). These results are reinforced by the Jaccard indices of dissimilarity indicating CA-soils lineages distribution is the more different of the other soils types, with respectively values 0.918 and 0.810 for CA-soils compared to FE-soils and VS-soils, and 0.579 for FE-soils compared to VS-soils.

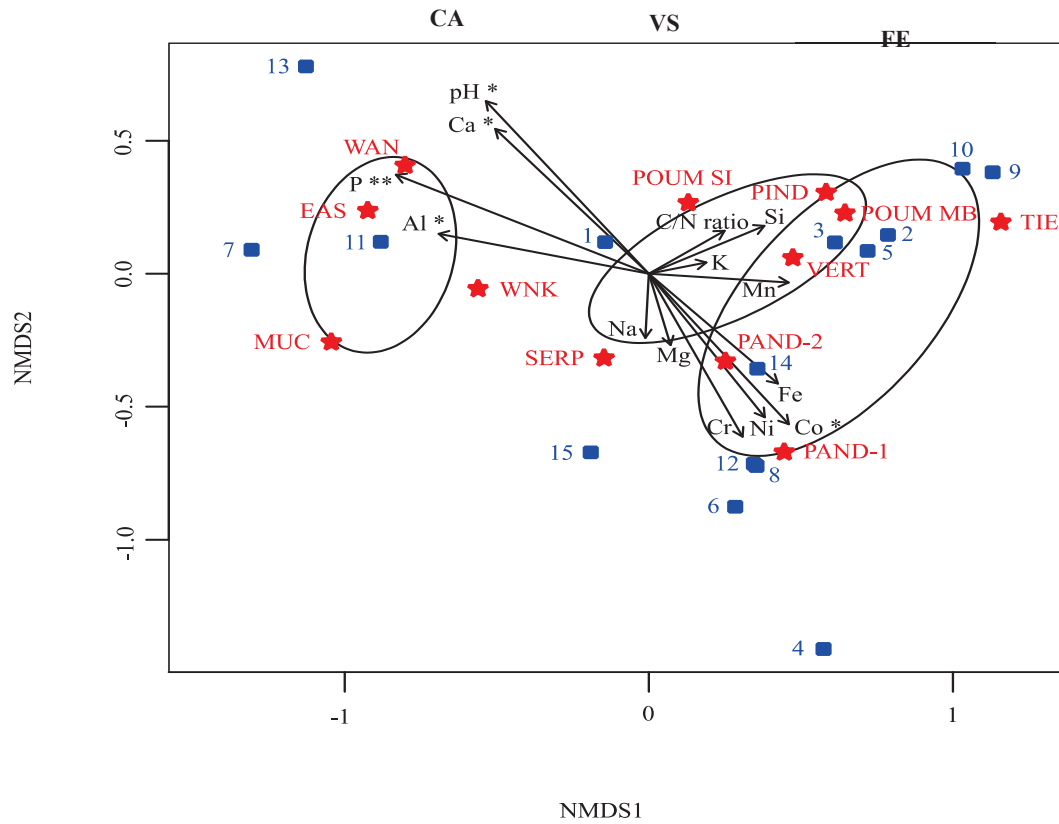
To evaluate the diversity of ECM fungi colonizing *A. spirorbis*, the observed and estimated richness Shannon and Simpson indexes were calculated (Table 4). The results showed that the observed species richness °D differed from the asymptotic estimated richness for both FE-soils and VS-soils. The observed and estimated Shannon 1D converged to similar values for the ECM distribution found in CA-soils and VS-soils (averaged variation of 5 % between observed and estimated indexes), while a gap of 27 % difference could be noticed between observed and estimated indexes in FE-soils. Finally, the Simpson 2D for the ECM distribution found in the 3 categories of soils showed close values between observed and estimated indexes with only 3.7 % differences in mean.

**Table 4:** Data summary of observed and asymptotic estimated indexes of diversity of the OTUs distribution according to the soil category based on “iNext” algorithm R Package as reported by Hsieh et al [27].

		Diversity indexes					
		Richness <sup>0</sup> D		Shannon ( <sup>1</sup> D)		Simpson ( <sup>2</sup> D)	
		Observed	Estimated	Observed	Estimated	Observed	Estimated
Soil category	CA	18	22.1 ± 4.8	2.71	2.92 ± 0.12	0.923	0.941 ± 0.012
	FE	33	225.6 ± 155	3.04	4.21 ± 0.45	0.917	0.934 ± 0.024
	VS	36	90.6 ± 37	3.14	3.57 ± 0.19	0.937	0.946 ± 0.011

Abbreviations: CA, FE and VS correspond to calcareous, ferrallitic and volcano-sedimentary soil category, respectively.

A Mantel test between the Bray Curtis matrix of the ECM diversity and the Euclidian matrix of the soil properties (i.e. pH, Corg/Norg ratio, total element contents as reported in ESM Table 1A, B and C) showed a significant correlation between these two parameters (at  $p < 0.01$ ) as reported in ESM Table 3. These positive results allowed to perform a Permanova analysis showing multiple significant correlations ( $p < 0.05$ ) between the edaphic parameters as pH, the elements content in soils (i.e. Ca, P, Al and Co) and the ECM OTUs distribution (ESM Table 4). In addition, no significant differences could be observed when considering OTUs data with or without singletons (ESM table 4). Consequently, only non-singleton OTUs were used in a non-metric dimensional scaling (NMDS) analyse in order for avoiding misleading inferences about composition that could have erased from influence on the dataset by low sampling. The NMDS results showed that the three soil categories harboured different fungal communities although those of ferrallitic and volcano-sedimentary soil types shared the most abundant lineages, in particular */tomentella/thelephora*, and at a lesser extent */boletus /pisolithus/scleroderma* and */russula/lactarius* (Figure 5). By contrast, the calcareous soils predominantly harboured the */sebacina* and */inocybe* lineages as well as */tomentella/thelephora* which was the most ubiquitous and abundant ECM lineage found in the three soil types (Figure 5). In addition, as reported in ESM Table 4, the Permanova results indicated that the variation of the ECM diversity in the study sites was significantly explained by major edaphic parameters as pH (31.4 %), soil contents of P (45.5 %), Ca (28.4), Al (29.5 %) and Co (26.1 %).



**Figure 5:** Two-dimensional NMDS ordination of the OTU distribution (without singletons) as fungal lineage patterns according to the sampling sites and the geochemical soil parameters including the pH, the C/N ratio and the total element contents. Blue squares represent OTUs grouped into lineages according Tedersoo et al. [25], numbers are lineage code. Red stars represent the 12 sites (Table 1) with a specific position in the graph according to their fungal lineages. Edaphic parameters are positioned with arrow according to the Permanova calculation, and asterisks indicate the level of significant relationship with the lineage distribution (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ). Ellipses group lineage according soil category i.e. calcareous (CA), ferralitic (FE) and volcano sedimentary (VS). Lineages codes: 1 /*tomentella-thelephora*; 2 /*boletus*; 3 /*pisolithus-scleroderma*; 4 /unspecified Boletaceae; 5 /*russula-lactarius*; 6 /*cortinarius*; 7 /*inocybe*; 8 /*amanita*; 9 /*tricholoma*; 10 /unspecified Agaricales; 11 /*sebacina*; 12 / *clavulina*; 13 /*peziza*; 14 /unspecified Ascomycota; 15 /*dothideomycetes incertae sedis*.

## Discussion

The originality of this study is to bring (i) new data about ectomycorrhizal diversity of a legume from tropical southern hemisphere and (ii) to focus on one endemic *Acacia* that colonized a tropical island [6] and which is able to grow on a large and contrasted variety of soils.

### *Ectomycorrhizal status and global diversity of the ECM community associated with A. spirorbis*

Australian phyllodinous acacias have been described for their ability to form symbiotic associations with ECM fungi [31]. The present study confirms the ECM status of *A. spirorbis* that belongs to the phyllodinous acacias [6] and it reports the existence of 76 fungal OTUs grouped into 15 ectomycorrhizal lineages. With more than 72 % of the OTUs found in association with this legume, the dominant ECM lineages belong to Basidiomycota and are */tomentella-thelephora*, */boletus*, */sebacina*, */russula-lactarius* and */pisolithus-scleroderma*. Compared to other previous studies about the diversity of ECM fungi associated with native or introduced plant species [32, 33, 23], the results of the present study indicate that the diversity of ECM fungi associated with *A. spirorbis* in New Caledonia is similar to the native range of ECM from other plant species. Indeed Smith et al [32] listed 161 ectomycorrhizal species associated with native *Quercus douglasii* in California. Ducousso et al [33] reported 38 ectomycorrhizal species associated with the introduced *Eucalyptus robusta* in Madagascar. The recent study by Smith et al [23] on the ectomycorrhizal community of *Pakaraimaea dipterocarpacea* and *Dicymbe jenmanii* in neo-tropical forest of Guyana listed 52 OTUs distributed into 11 ectomycorrhizal groups based on 255 sequences analysed. Considering the lack of data about the diversity of ECM communities associated with acacias, this study brings then original data about *A. spirorbis* to form symbiotic associations particularly with a large spectrum of ECM fungi on different edaphic constraints associations.

### ***Diversity of the ectomycorrhizal communities as a function of the soil category***

Regarding the ECM diversity and the lineages richness associated with *A. spirorbis*, our results indicate that Basidiomycota are dominant whatever the type of soil. Concerning the diversity of the ECM communities associated with *A. spirorbis* as a function of the soil category our data showed that there is no significant difference between the ECM communities from ferrallitic (FE-) and volcano-sedimentary (VS-) soils. The main common lineages for these both type of soil are: */botelus*, */tomentella-thelephora*, */pisolithus-scleroderma* and */russula-lactarius*. These results are in agreement with previous results reported by Moser et al [12] that showed no significant difference between the ECM communities associated with *Quercus* spp. grown on serpentinic (ferrallitic) and non-serpentinic soils. Moreover, our results (i.e. 12 lineages in FE-soils compared to 10 lineages in VS-soils) confirm that, despite their large contents in potentially toxic metals, low contents in nutrients (N, P, K) and strongly unbalanced Ca/Mg ratio, FE-soils do not limit the diversity of the ectomycorrhizal community associated with *A. spirorbis*. Such a conclusion is in agreement with the results already reported for serpentinic (ferrallitic) soils by [13, 14]. These results are in agreement with those from previous studies focused on the ectomycorrhizal status and ECM fungal species richness associated with other dominant ECM plants in New Caledonia such as *Melaleuca* spp., *Nothofagus* spp., *Tristaniopsis* spp. and *Sannantha* spp [34, 11, 9, 35]. Moreover, when *A. spirorbis* grow in association with *Melaleuca* spp. or *Tristaniopsis* spp., it shares the same ECM lineages such as */tomentella-thelephora*, */russula-lactarius* and */pisolithus-scleroderma* [34, 11, 9, 35]. Regarding the presence of */cortinari* lineage only found in FE-soils, this result is in agreement with the recurring occurrence of *Cortinariaceae* as ectomycorrhizal fungi reported for plants such as *Tristaniopsis* spp. and *Nothofagus* spp. only growing on soils developed upon ultramafic rocks that are equivalent to our Fe-soils [34, 35].

On the opposite, the diversity of ECM communities associated with *A. spirorbis* on CA-soils is very low and significantly different from those found on FE- and VS-soils; this poverty may be linked to high soil fertility [e.g. 36, 37]. Notwithstanding, it is important to consider that CA-soils were sampled in one of the Loyalty Islands (i.e. Lifou) that emerged during the Miocene, while the soils of the main island developed on bedrocks aged of 35 MA [1]. So the low ECM fungal diversity associated with *A. spirorbis* on CA-soils may result as a weak fungal colonisation of these soils due to the island isolation.

This would be in agreement with the island biogeographical theory regarding dynamics of fungi species: the fungal island colonisation is mainly driven by spore dispersion but plant host colonisation is limited by distance and so impacts the ECM richness [38]. On such isolated CA-soils, the results showed also the dominance of Basidiomycota as observed in UF and VS-soils but only 4 lineages were found in association with *A. spirorbis* dominated by */thelephora-tomentella* and */sebacina* lineages. The presence of */thelephora-tomentella* lineages in these CA-soils is in agreement with the results of previous studies that reported the occurrence of *Tomentella* species as ECM symbionts for plants growing on coral reef island [39]. Moreover and not surprisingly the */thelephora-tomentella* lineage is dominant: such lineage is known to host ubiquitous taxa [e.g. 40] that are common and dominant ECM fungi, colonizing a large spectrum of diverse environments, especially in primary successional habitats [41, 42].

Altogether, our results about the diversity of the ECM communities associated with *A. spirorbis* in the 3 studied soil categories indicated that this legume has the capacity to develop symbiotic associations with ECM fungi regardless of the *in situ* fungal community.

#### ***Ectomycorrhizal diversity in relation with edaphic parameters***

The diversity of the ECM communities associated with *A. spirorbis* showed significant correlations with some major edaphic parameters for each of the three soil categories (Figure 4).

First, the distribution of the ECM diversity between site is correlated with soil pH, the highest diversity being found in the most acidic soils (i.e.  $\text{pH} = 5.7 \pm 1.1$  for VS-soils and  $\text{pH} = 6.1 \pm 0.5$  for FE-soils compared to  $\text{pH} = 7.6 \pm 0.8$  for CA-soils). This result is in agreement with previous results of a larger scale study on the description of forest fungal diversity, which showed a negative correlation between the fungal richness and the number of OTUs for most fungal taxonomic groups and the increase in soil pH [43]. Second, in our study the diversity of the ECM communities was found to negatively correlate with the Ca and P contents of the selected soils, with a larger diversity of the ECM communities in the soils with the lowest Ca and P contents (i.e. VS-soils and FE-soils). Such a negative correlation between the P contents of the soil and the ECM diversity might be explained by the fact that the limitation of phosphorous in soils is known to promote the growth of ECM fungi since major role of ECM fungi is to provide P to their host plants [44, 45]. Similarly, the negative correlation between the Ca contents of



the soil and the ECM diversity might be explained by the fact that a low Ca content in soil is known to enhance the occurrence and diversity of ECM fungi [46, 47], mechanisms supporting these enhancement are still unknown. Altogether, our results are in agreement with the recent hypothesis that major edaphic parameters such as Ca, P and pH play a key role in structuring the soil fungal diversity at the global scale [17]. Moreover, our results also show some significant correlations between the diversity of the ECM communities and the contents in potentially toxic elements in the soils, as already reported by De Beeck et al [48]. Indeed, in FE-soils, the diversity of the ECM community is positively correlated with the Co content, while in CA-soil it is negatively correlated with the Al content. Such correlations between (i) edaphic parameters and (ii) the ECM communities associated with *A. spirorbis* suggest that ECM fungi might play a significant role in the adaptation of the plant to the various soils as already demonstrated when the ECM fungus *P. albus* was inoculated on *A. spirorbis* grown on an artificial substrate similar to Fe-soils [9]. First, ECM communities associated with *A. spirorbis* may enhance Ca and P plant host nutrition. Secondly, these ECM may also decrease the metal toxicity effects (Al and Co) on plant growth.

**Conflict of interest:** The authors declare that they have no conflict of interest.

### **Acknowledgments**

This work was conducted as part of an industrial agreement through the French program of PhD training research CIFRE with grant number N° 2013/1434 involving the industrial company Koniambo Nickel SAS. In addition this work was supported by the French National Agency for Research (ANR) financial support through the BIOADAPT Program 2012 [grant number ANR-12-ADAP-0017 ADASPIR].

## References

- [1] Fritsch E (2012) Les sols. In: Bonvallot J, Gay JC, Habert E (eds) Atlas de la Nouvelle-Calédonie. Marseille, France, IRD, pp 73-76.
- [2] Morat P, Jaffré T, Tronchet F, Munzinger J, Pillon Y, Veillon JM, Chalopin M, Birnbaum P, Rigault F, Dagostini G, Tinel J Lowry II PP (2012) The taxonomic reference base Florical and characteristics of the native vascular flora of New Caledonia. *Adansonia* 34:179-221.
- [3] Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Da Fonseca GAB, Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403:853-858.
- [4] Isnard S, L'huillier, L Rigault F, Jaffré T (2016) How did the ferrallitic soils shape the flora of the New Caledonian hotspot? *Plant Soil* 403:53-76.
- [5] Labillardière JJ (1825) *Sertum austro-caledonicum. Parisiis, ex Typographia dominæ Huzard (née Vallat la Chapelle), viâ de l'Eperon Saint-André-des-Arts* 7:69.
- [6] Brown GK, Murphy DJ, Kidman J, Ladiges PY (2012) Phylogenetic connections of phyllodinous species of *Acacia* outside Australia are explained by geological history and human-mediated dispersal. *Aust Syst Bot* 25:390-403.
- [7] Grangeteau C, Ducousso M, Fritsch E, Juillot F, Jourand P, Acherar S, Lebrun M, Klonowska A (2012) Diversity of nitrogen fixing bacteria associated to the New Caledonian ubiquitous tree *Acacia spirorbis*. In: EGU General Assembly (ed) Abstracts of European Geosciences Union, Vienna, Austria, 4892.

- [8] Ducousso M, Galiana A, Prin Y, Hannibal L, Jourand P, Klonowska A, Carriconde F, Lebrun M, Fritsch E, Juillot F, Amir H (2014) *Acacia spirorbis* a model plant to study the contribution of symbiotic root microorganisms in plant adaptation to soil constraints: news and prospects. In: Griffin R (ed) Proceedings of Acacia 2014 Conference - Sustaining the Future of Acacia Plantation Forestry. IUFRO Acacia 2014, Hue city, Vietnam, p 51.
- [9] Jourand P, Hannibal L, Majorel C, Mengant S, Ducousso M, Lebrun M (2014) Ectomycorrhizal *Pisolithus albus* inoculation of *Acacia spirorbis* and *Eucalyptus globulus* grown in ultramafic topsoil enhances plant growth and mineral nutrition while limits metal uptake. J Plant Physiol 171:164-172.
- [10] Jaffré T, Rigault F, Sarrailh JM (1994) La végétalisation des anciens sites miniers. Bois For Trop 242:45-57.
- [11] Jourand P, Ducousso M, Loulergue-Majorel C, Hannibal L, Santoni S, Prin Y, Lebrun M (2010) Ultramafic soils from New Caledonia structure *Pisolithus albus* in ecotype. FEMS Microbiol Ecol 72:238-249.
- [12] Moser MA, Frank JL, D'Allura JA, Southworth D (2009) Ectomycorrhizal communities of *Quercus garryana* are similar on serpentine and nonserpentine soils. Plant Soil 315:185-194.
- [13] Branco S (2010) Serpentine soils promote ectomycorrhizal fungal diversity. Mol Ecol 19:5566-5576.
- [14] Branco S, Ree RH (2010) Serpentine soils do not limit mycorrhizal fungal diversity. PloS ONE 5:e11757.

- [15] Peay KG, Kennedy PG, Davies SJ, Tan S, Bruns TD (2010) Potential link between plant and fungal distributions in a dipterocarp rainforest: community and phylogenetic structure of tropical ectomycorrhizal fungi across a plant and soil ecotone. *New Phytol* 185:529-42.
- [16] Roy M, Rochet J, Manzi S, Jargeat P, Gryta H, Moreau PA, Gardes M (2013) What determines *Alnus*-associated ectomycorrhizal community diversity and specificity? A comparison of host and habitat effects at a regional scale. *New Phytol* 198:1228-1238.
- [17] Tedersoo L, Bahram M, Põlme S, et al (2014) Global diversity and geography of soil fungi. *Science* 346:6213:1266688/1-10
- [18] Chesworth W, Arbestain MC, Macias F, Spaargaren O, Mualen Y, Morel-Seytoux HJ, Horwath WR, Almendros G, Grossl PR, Sparks DL, Fairbridge RW, Singer A, Eswaran H, Micheli E (2008) Classification of soils: World reference Base (WRB) for soils resources. *Encyclopedia of Soil Science*, Chesworth W (ed) Springer Netherland, ISBN: 978-1-4020-3995-9.
- [19] Perrier N, Amir H, Colin F (2006) Occurrence of mycorrhizal symbioses in the metal-rich lateritic soils of the Koniambo Massif, New Caledonia. *Mycorrhiza* 16:449-458.
- [20] Gardes M, Bruns TD (1993) ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes. Application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol* 2:113-118.
- [21] White TJ, Bruns TD, Lee SB, Taylor JW (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, London, UK, 1990, 315-322.

- [22] Abarenkov K, Tedersoo L, Nilsson RH, et al (2010) PlutoF a Web Based Workbench for Ecological and Taxonomic Research, with an Online Implementation for Fungal ITS Sequences. *Evol Bioinform Online* 6:189-196.
- [23] Smith ME, Henkel TW, Uehling JK, Fremier AK, Clarke HD, Vilgalys R (2013) The ectomycorrhizal fungal community in a neotropical forest dominated by the endemic *Dipterocarp Pakaraimaea dipterocarpacea*. *PLoS ONE* 8:e55160.
- [24] Li W, Godzik A (2006) Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics* 22:1658-1659.
- [25] Tedersoo L, May TW, Smith ME (2010) Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza* 20:217-263.
- [26] Zack JC, Willig MR (2004) Fungal biodiversity and patterns. In: Mueller GM, Bills GF, Foster MS (eds) *Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods*. Elsevier Academic Press, San Diego, California, USA, pp 59-75.
- [27] Hsieh TC, Ma KH, Chao A (2016) iNEXT: an R package for rarefaction and extrapolation of species diversity (Hill numbers). *Method Ecol Evol* DOI: 10.1111/2041-210X.12613.
- [28] Chao A, Chiu CH, Jost L (2016) Statistical challenges of evaluating diversity patterns across environmental gradients in mega-diverse communities. *J Veg Sci* 27:434-438.
- [29] Anderson MJ (2001) A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecol* 26:32-46.

- [30] R Development Core Team (2011) "R: A Language and Environment for Statistical Computing". R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>
- [31] Reddell P, Warren RM (1987) Inoculation of acacias with mycorrhizal fungi potential benefits in Australian Acacias in developing countries. ACIAR Proceedings 16:50-53.
- [32] Smith ME, Douhan GW, Rizzo DM (2007) Ectomycorrhizal community structure in a xeric *Quercus* woodland based on rDNA sequence analysis of sporocarps and pooled roots. New Phytol 174:847-63.
- [33] Ducousso M, Duponnois R, Thoen D, Prin Y (2012) Diversity of Ectomycorrhizal Fungi Associated with *Eucalyptus* in Africa and Madagascar. Internat J For Res ID 450715.
- [34] Waseem M, Ducousso M, Prin Y, Domergue O, Hannibal L, Majorel C, Jourand P, Galiana A (2017) Ectomycorrhizal fungal diversity associated with endemic *Tristania* spp. (Myrtaceae) in ultramafic and volcano-sedimentary soils in New Caledonia. Mycorrhiza 27(4):407-413.
- [35] Prin Y, Ducousso M, Tassin J, Béna G, Jourand P, Dumontet V, Moulin L, Contesto C, Ambrosi JP, Chaintreuil C, Dreyfus B, Lebrun M (2012) Ectotrophic mycorrhizal symbioses are dominant in natural ferrallitic forest ecosystems of New Caledonia. In: Hafidi M, Duponnois R (eds). The Mycorrhizal Symbioses in Mediterranean Environment. Nova Science, New-York, pp 25-48.
- [36] Marx DH, Hatch AB, Mendicino JF (1977) High soil fertility decreases sucrose content and susceptibility of loblolly pine roots to ectomycorrhizal infection by *Pisolithus tinctorius*. Can J Bot 55(12):1569-1574.

- [37] Kranabetter JM, Friesen J, Gamiet S, Kroeger P (2009) Epigeous fruiting bodies of ectomycorrhizal fungi as indicators of soil fertility and associated nitrogen status of boreal forests. *Mycorrhiza* 19(8):535-548.
- [38] Peay KG, Schubert MG, Nguyen NH, Bruns TD (2012) Measuring ectomycorrhizal fungal dispersal: macroecological patterns driven by microscopic propagules. *Mol Ecol* 21:4122-4136.
- [39] Chambers SM, Hitchcock CJ, Cairney JWG (2005) Ectomycorrhizal mycobionts of *Pisonia grandis* on coral cays in the Capricorn-Bunker group, Great Barrier Reef, Australia. *Mycol Res* 109:1105-1111.
- [40] Hilszczanska D, Sierota Z (2006) Persistence of ectomycorrhizas by *Thelephora terrestris* on outplanted Scots pine seedlings. *Acta Mycologia* 41(2):313-318.
- [41] Jakucs E, Erős-Honti Z (2008) Morphological-anatomical characterization and identification of *Tomentella* ectomycorrhizas. *Mycorrhiza* 18:277-285.
- [42] Peintner U, Dämmrich F (2012) *Tomentella alpina*, an important mycobiont of alpine ectotrophic plants. *Mycol Prog* 11:109-19.
- [43] Geml J, Pastor N, Fernandez L, Pacheco S, et al (2014) Large-scale fungal diversity assessment in the Andean Yungas forests reveals strong community turnover among forest types along an altitudinal gradient. *Mol Ecol* 23:2452-2472.
- [44] Smith SE, Read D (2008) *Mycorrhizal symbiosis*, Third Edition. Academic Press, London.
- [45] Laliberte E, Lambers, H, Burgess TI, Wright SJ (2014) Phosphorus limitation, soil-borne pathogens and the coexistence of plant species in hyperdiverse forests and shrublands. *New Phytol* 206: 507-521.

[46] Pöhlme S, Bahram M, Yamanaka T et al (2013) Biogeography of ectomycorrhizal fungi associated with alders (*Alnus* spp.) in relation to biotic and abiotic variables at the global scale. *New Phytol* 198:1239-1249.

[47] Teste FP, Veneklaas EJ, Dixon KW, Lambers H (2014) Complementary plant nutrient-acquisition strategies promote growth of neighbour species. *Funct Ecol* 28:819-828.

[48] De Beeck MO, Lievens B, Busschaert P, Rineau F, Smits M, Vangronsveld J, Colpaert JV (2015) Impact of metal pollution on fungal diversity and community structures. *Environ Microbiol* 17:2035-2047.



**ESM Table 1:** Geochemical characteristics of the bulk soils. All data are means  $\pm$  stdv of the element contents measured in soil samples (n=3) where ECM and roots of *Acacia spirorbis* were sampled.

**A:** Calcareous soils (CA-soils).

Site	EAS	MUC	WAN	WNK
Geochemical characteristics				
pH	7.7 $\pm$ 0.2	6.8 $\pm$ 0.1	7.7 $\pm$ 0.1	7.0 $\pm$ 0.1
Total element soil contents				
C mg/kg	9,550 $\pm$ 919	7,750 $\pm$ 777	6,166 $\pm$ 1,985	10,500 $\pm$ 3,959
N mg/kg	13,945 $\pm$ 1,746	4,885 $\pm$ 2,679	2,660 $\pm$ 677	4,575 $\pm$ 1,675
P mg/kg	6,727 $\pm$ 923	6,087 $\pm$ 1,033	7,431 $\pm$ 2,050	8,284 $\pm$ 2,129
K mg/kg	226 $\pm$ 80	361 $\pm$ 68	210 $\pm$ 50	409 $\pm$ 34
Ca mg/kg	113,675 $\pm$ 42,376	8,660 $\pm$ 4,454	84,693 $\pm$ 44,170	12,610 $\pm$ 2,729
Mg mg/kg	2,509 $\pm$ 89	3,090 $\pm$ 470	36,313 $\pm$ 19,238	2,449 $\pm$ 490
Al mg/kg	60,735 $\pm$ 4,405	194,930 $\pm$ 24,395	169,896 $\pm$ 42,201	197,125 $\pm$ 11,561
Fe mg/kg	52,605 $\pm$ 5,098	165,375 $\pm$ 18,999	115,536 $\pm$ 28,124	157,135 $\pm$ 10,359
Co mg/kg	6.5 $\pm$ 2	59 $\pm$ 7	54 $\pm$ 10	63.5 $\pm$ 3
Cr mg/kg	532 $\pm$ 56	872 $\pm$ 119	570 $\pm$ 112	561 $\pm$ 31
Mn mg/kg	1,693 $\pm$ 61	3,459 $\pm$ 118	3,120 $\pm$ 831	5,562 $\pm$ 83
Ni mg/kg	26 $\pm$ 12	58 $\pm$ 2.5	59 $\pm$ 24	39 $\pm$ 4
Si mg/kg	4,060 $\pm$ 424	12,915 $\pm$ 1,675	2,470 $\pm$ 1,316	32,565 $\pm$ 1,746

**B:** Ferralitic soils (Fe-soils).

Site	TIE	PIND	PAND-1	PAND-2
Geochemical characteristics				
pH	5.3 $\pm$ 0.2	6.8 $\pm$ 0.3	6.4 $\pm$ 0.1	5.9 $\pm$ 0.1
Total element soil contents				
C mg/kg	750 $\pm$ 495	4,900 $\pm$ 268	3,150 $\pm$ 495	800 $\pm$ 141
N mg/kg	320 $\pm$ 127	2,175 $\pm$ 742	1,170 $\pm$ 028	380 $\pm$ 56
P mg/kg	126 $\pm$ 2	140 $\pm$ 25	33.5 $\pm$ 2	53.5 $\pm$ 7
K mg/kg	70 $\pm$ 5	1,151 $\pm$ 191	73 $\pm$ 11	149 $\pm$ 82
Ca mg/kg	435 $\pm$ 27	4,635 $\pm$ 1,605	1,380 $\pm$ 438	150 $\pm$ 28
Mg mg/kg	1,638 $\pm$ 559	9,099 $\pm$ 1,989	39,370 $\pm$ 20,103	14,297 $\pm$ 6,477
Al mg/kg	44,035 $\pm$ 5,329	634 $\pm$ 167	17,860 $\pm$ 3,733	13,805 $\pm$ 4,193
Fe mg/kg	523,555 $\pm$ 17,656	52,405 $\pm$ 3,005	289,175 $\pm$ 54,171	327,680 $\pm$ 112,981
Co mg/kg	659 $\pm$ 187	261740 $\pm$ 16206	594 $\pm$ 54	797 $\pm$ 57
Cr mg/kg	12,550 $\pm$ 2,066	517 $\pm$ 154	24,865 $\pm$ 6,047	31,598 $\pm$ 12,230
Mn mg/kg	10,911 $\pm$ 2,170	19,965 $\pm$ 957	5,772 $\pm$ 1,324	4,782 $\pm$ 321
Ni mg/kg	2,333 $\pm$ 487	4,452 $\pm$ 525	8,229 $\pm$ 215	3,970 $\pm$ 972
Si mg/kg	14,480 $\pm$ 5,176	7,756 $\pm$ 3,643	126,140 $\pm$ 40,686	110,525 $\pm$ 70,788

**C: Volcano-sedimentary soils (VS-soils).**

Site	POUM MB	POUM SI	VERT	SERP
Geochemical characteristics				
pH	6.5 ± 0.1	7.7 ± 0.3	5.8 ± 0.1	6.5 ± 0.1
Total element soil contents				
C mg/kg	2,066 ± 101	2,125 ± 214	4,550 ± 33	3,300 ± 442
N mg/kg	1,026 ± 276	330 ± 16	1,695 ± 11	1,426 ± 152
P mg/kg	101 ± 19	25 ± 15	162 ± 48	431 ± 160
K mg/kg	6,104 ± 241	25 ± 19	236 ± 97	4,930 ± 206
Ca mg/kg	1,020 ± 53	207 ± 71	6,095 ± 403	46,780 ± 10,283
Mg mg/kg	44,445 ± 4,357	84 ± 23	8,170 ± 703	34,791 ± 5,732
Al mg/kg	67,286 ± 11,470	225 ± 75	76,800 ± 3,167	81,020 ± 2,958
Fe mg/kg	61,920 ± 2,413	85 ± 8	89,865 ± 2,015	62,980 ± 1,666
Co mg/kg	98 ± 13	0.0 ± 0.0	47 ± 3	51 ± 3
Cr mg/kg	1,508 ± 142	133 ± 84	343 ± 5	359 ± 63
Mn mg/kg	818 ± 114	3 ± 1	1,008 ± 107	1,177 ± 151
Ni mg/kg	1,792 ± 129	23 ± 18	48 ± 2	241 ± 73
Si mg/kg	265,167 ± 17,347	435,792 ± 11,872	226,270 ± 749	209,353 ± 7,707

**ESM Table 2:** Récapitulatif de l'ensemble des données moléculaires, notamment les numéros d'accèsion, les codes des OTU et les résultats de BlastN ainsi que leur affectation à une lignée [25].

Site reference	ECM DNA ITS sequence code	DDBJ DNA bank accession number	Length sequence (pb)	OTU code	BLAST identification			
					Genus identification	Lineages	% identity	E-value
EAS	EAS-01	LC122057	534	AH05	Sebacina sp.	/sebacina	91.70	0.0
	EAS-02	LC122058	534	AH05	Sebacina sp.	/sebacina	91.70	0.0
	EAS-03	LC122059	534	AH05	Sebacina sp.	/sebacina	91.70	0.0
	EAS-04	LC122060	534	AH05	Sebacina sp.	/sebacina	91.70	0.0
	EAS-05	LC122061	534	AH05	Sebacina sp.	/sebacina	91.70	0.0
	EAS-06	LC122062	534	AH06	Sebacina sp.	/sebacina	91.79	0.0
	EAS-07	LC122063	578	AH08	Tomentella sp.	/tomentella-thelephora	97.19	0.0
	EAS-08	LC122064	419	AH09	Sebacina sp.	/sebacina	96.43	0.0
	EAS-09	LC122065	579	AH10	Tomentella sp.	/tomentella-thelephora	93.41	0.0
	EAS-10	LC122066	576	AH10	Tomentella sp.	/tomentella-thelephora	93.38	0.0
	EAS-11	LC122067	578	AH10	Tomentella sp.	/tomentella-thelephora	93.40	0.0
	EAS-12	LC122068	578	AH10	Tomentella sp.	/tomentella-thelephora	93.28	0.0
	EAS-13	LC122069	578	AH10	Tomentella sp.	/tomentella-thelephora	93.40	0.0
	EAS-14	LC122070	583	AH17	Inocybe sp.	/inocybe	89.66	0.0
	EAS-15	LC122071	629	AH17	Inocybe sp.	/inocybe	89.01	0.0
	EAS-16	LC122072	578	AH19	Tomentella sp.	/tomentella-thelephora	90.41	0.0
	EAS-17	LC122073	578	AH19	Tomentella sp.	/tomentella-thelephora	90.41	0.0
	EAS-18	LC122074	578	AH19	Tomentella sp.	/tomentella-thelephora	90.41	0.0
	EAS-19	LC122075	568	AH20	Sebacina sp.	/sebacina	92.36	0.0
	EAS-20	LC122076	568	AH20	Sebacina sp.	/sebacina	92.19	0.0
	EAS-21	LC122077	568	AH20	Sebacina sp.	/sebacina	92.36	0.0

Site reference	ECM DNA ITS sequence code	DDBJ DNA bank accession number	Length sequence (pb)	OTU code	BLAST identification			
					Genus identification	Lineages	% Identity	E-value
EAS	EAS-22	LC122078	578	AH31	Tomentella sp.	/tomentella-thelephora	98.96	0.0
	EAS-23	LC122079	534	AH32	Sebacina sp.	/sebacina	94.45	0.0
	EAS-24	LC122080	538	AH32	Sebacina sp.	/sebacina	96.11	0.0
	EAS-25	LC122081	604	AH46	Inocybe sp.	/inocybe	89.29	0.0
MUC	MUC-01	LC122082	538	AH09	Sebacina sp.	/sebacina	95.94	0.0
	MUC-02	LC122083	539	AH09	Sebacina sp.	/sebacina	95.94	0.0
	MUC-03	LC122084	629	AH17	Inocybe sp.	/inocybe	89.01	0.0
	MUC-04	LC122085	618	AH25	Inocybe sp.	/inocybe	88.52	0.0
	MUC-05	LC122086	402	AH73	Tomentella sp.	/tomentella-thelephora	95.07	0.0
PAND-1	PAND1-01	LC122087	541	AH00	Pisolithus sp.	/pisolithus-scleroderma	99.82	0.0
	PAND1-02	LC122088	541	AH00	Pisolithus sp.	/pisolithus-scleroderma	99.82	0.0
	PAND1-03	LC122089	541	AH00	Pisolithus sp.	/pisolithus-scleroderma	99.82	0.0
	PAND1-04	LC122090	542	AH00	Pisolithus sp.	/pisolithus-scleroderma	99.63	0.0
	PAND1-05	LC122091	543	AH00	Pisolithus sp.	/pisolithus-scleroderma	98.51	0.0
	PAND1-06	LC122092	541	AH00	Pisolithus sp.	/pisolithus-scleroderma	100.00	0.0
	PAND1-07	LC122093	537	AH05	Sebacina sp.	/sebacina	89.72	0.0
	PAND1-08	LC122094	724	AH07	Phylloporus sp.	/boletus	93.84	0.0
	PAND1-09	LC122095	530	AH12	Lactarius sp.	/russula-lactarius	85.24	9,00E-137
	PAND1-10	LC122096	530	AH12	Lactarius sp.	/russula-lactarius	85.24	9,00E-137
	PAND1-11	LC122097	605	AH13	Cortinarius sp.	/cortinarius	88.42	0.0
	PAND1-12	LC122098	620	AH42	Boletellus sp.	/boletus	92.87	0.0

Site reference	ECM DNA ITS sequence code	DDBJ DNA bank accession number	Length sequence (pb)	OTU code	BLAST identification			
					Genus identification	Lineages	% Identity	E-value
PAND-1	PAND1-13	LC122099	360	AH74	Cortinarius sp.	/cortinarius	98.61	0.0
PAND-2	PAND2-01	LC122100	542	AH00	unspecified Boletaceae sp.	unspecified Boletaceae	99.63	0.0
	PAND2-02	LC122101	668	AH04	unspecified Ascomycota sp.	unspecified Ascomycota	99.24	0.0
	PAND2-03	LC122102	640	AH04	unspecified Ascomycota sp.	unspecified Ascomycota	99.22	0.0
	PAND2-04	LC122103	1030	AH23	Pisolithus sp.	/pisolithus-scleroderma	78.70	1,00E-163
	PAND2-05	LC122104	410	AH33	Boletus sp.	/boletus	99.47	0.0
	PAND2-06	LC122105	379	AH33	Boletus sp.	/boletus	99.47	0.0
	PAND2-07	LC122106	394	AH34	Cortinarius sp.	/cortinarius	99.23	0.0
	PAND2-08	LC122107	379	AH34	Cortinarius sp.	/cortinarius	99.73	0.0
	PAND2-09	LC122108	621	AH41	Cortinarius sp.	/cortinarius	87.35	0.0
	PAND2-10	LC122109	598	AH48	Clavulina sp.	/clavulina	92.31	0.0
	PAND2-11	LC122110	588	AH51	Russula sp.	/russula-lactarius	95.25	0.0
	PAND2-12	LC122111	580	AH55	Tomentella sp.	/tomentella-thelephora	99.83	0.0
	PAND2-13	LC122112	577	AH58	Thelephora sp.	/tomentella-thelephora	87.22	6,00E-179
	PAND2-14	LC122113	541	AH64	Amanita sp.	/amanita	96.12	0.0
	PAND2-15	LC122114	490	AH69	Sebacina sp.	/sebacina	92.22	8,00E-167
	PAND2-16	LC122115	485	AH70	unspecified Ascomycota sp.	unspecified Ascomycota	92.78	2,00E-108
PIND	PIND-01	LC122116	542	AH00	Pisolithus sp.	/pisolithus-scleroderma	99.45	0.0
	PIND-02	LC122117	541	AH00	Pisolithus sp.	/pisolithus-scleroderma	99.63	0.0
	PIND-03	LC122118	590	AH01	Scleroderma sp.	/pisolithus-scleroderma	99.32	0.0
	PIND-04	LC122119	643	AH04	Boletus sp.	/boletus	99.53	0.0

Site reference	ECM DNA ITS sequence code	DDBJ DNA bank accession number	Length sequence (pb)	OTU code	BLAST identification			
					Genus identification	Lineages	% Identity	E-value
PIND	PIND-05	LC122120	643	AH04	Boletus sp.	/boletus	99.53	0.0
	PIND-06	LC122121	643	AH04	Boletus sp.	/boletus	99.53	0.0
	PIND-07	LC122122	530	AH12	Lactarius sp.	/russula-lactarius	85.77	7,00E-143
	PIND-08	LC122123	530	AH12	Lactarius sp.	/russula-lactarius	85.77	7,00E-143
	PIND-09	LC122124	531	AH12	Lactarius sp.	/russula-lactarius	84.53	6,00E-134
	PIND-10	LC122125	591	AH18	Russula sp.	/russula-lactarius	99.83	0.0
	PIND-11	LC122126	607	AH26	Tomentella sp.	/tomentella-thelephora	98.19	0.0
	PIND-12	LC122127	720	AH36	Boletus sp.	/boletus	80.17	4,00E-62
	PIND-13	LC122128	709	AH38	Boletus sp.	/boletus	85.66	8,00E-134
	PIND-14	LC122129	581	AH53	Tomentella sp.	/tomentella-thelephora	93.81	0.0
	PIND-15	LC122130	541	AH65	Pisolithus sp.	/pisolithus-scleroderma	96.49	0.0
	PIND-16	LC122131	513	AH68	Austroboletus sp.	/boletus	85.62	1,00E-125
POUM MB	POUMMB-01	LC122132	541	AH00	Pisolithus sp.	/pisolithus-scleroderma	99.82	0.0
	POUMMB-02	LC122133	589	AH01	Scleroderma sp.	/pisolithus-scleroderma	100.00	0.0
	POUMMB-03	LC122134	590	AH01	Scleroderma sp.	/pisolithus-scleroderma	99.83	0.0
	POUMMB-04	LC122135	594	AH01	Scleroderma sp.	/pisolithus-scleroderma	99.33	0.0
	POUMMB-05	LC122136	590	AH01	Scleroderma sp.	/pisolithus-scleroderma	99.83	0.0
	POUMMB-06	LC122137	590	AH01	Scleroderma sp.	/pisolithus-scleroderma	99.32	0.0
	POUMMB-07	LC122138	590	AH01	Scleroderma sp.	/pisolithus-scleroderma	99.83	0.0
	POUMMB-08	LC122139	591	AH01	Scleroderma sp.	/pisolithus-scleroderma	99.66	0.0
	POUMMB-09	LC122140	394	AH01	Scleroderma sp.	/pisolithus-scleroderma	100.00	0.0

Site reference	ECM DNA ITS sequence code	DDBJ DNA bank accession number	Length sequence (pb)	OTU code	BLAST identification			
					Genus identification	Lineages	% Identity	E-value
POUM MB	POUMMB-10	LC122141	590	AH01	Scleroderma sp.	/pisolithus-scleroderma	99.32	0.0
	POUMMB-11	LC122142	571	AH02	Russula sp.	/russula-lactarius	91.81	0.0
	POUMMB-12	LC122143	587	AH02	Russula sp.	/russula-lactarius	91.51	0.0
	POUMMB-13	LC122144	586	AH02	Russula sp.	/russula-lactarius	91.68	0.0
	POUMMB-14	LC122145	586	AH02	Russula sp.	/russula-lactarius	91.87	0.0
	POUMMB-15	LC122146	586	AH02	Russula sp.	/russula-lactarius	91.71	0.0
	POUMMB-16	LC122147	587	AH02	Russula sp.	/russula-lactarius	91.04	0.0
	POUMMB-17	LC122148	586	AH02	Russula sp.	/russula-lactarius	90.88	0.0
	POUMMB-18	LC122149	586	AH02	Russula sp.	/russula-lactarius	91.89	0.0
	POUMMB-19	LC122150	586	AH02	Russula sp.	/russula-lactarius	91.87	0.0
	POUMMB-20	LC122151	586	AH02	Russula sp.	/russula-lactarius	91.87	0.0
	POUMMB-21	LC122152	865	AH03	Boletellus sp.	/boletus	83.23	5,00E-161
	POUMMB-22	LC122153	578	AH08	Tomentella sp.	/tomentella-thelephora	97.36	0.0
	POUMMB-23	LC122154	578	AH08	Tomentella sp.	/tomentella-thelephora	97.18	0.0
	POUMMB-24	LC122155	578	AH08	Tomentella sp.	/tomentella-thelephora	97.18	0.0
	POUMMB-25	LC122156	578	AH14	Tomentella sp.	/tomentella-thelephora	97.06	0.0
	POUMMB-26	LC122157	537	AH22	unspecified Ascomycota sp.	unspecified Ascomycota	93.74	0.0
	POUMMB-27	LC122158	537	AH22	unspecified Ascomycota sp.	unspecified Ascomycota	93.74	0.0
	POUMMB-28	LC122159	763	AH23	Boletellus sp.	/boletus	81.24	8,00E-134
	POUMMB-29	LC122160	641	AH24	Lactarius sp.	/russula-lactarius	93.21	0.0
	POUMMB-30	LC122161	354	AH24	Lactarius sp.	/russula-lactarius	95.81	6,00E-162

Site reference	ECM DNA ITS sequence code	DDBJ DNA bank accession number	Length sequence (pb)	OTU code	BLAST identification			
					Genus identification	Lineages	% Identity	E-value
POUM MB	POUMMB-31	LC122162	549	AH27	Tricholomataceae sp.	/tricholoma	90.56	3,00E-142
	POUMMB-32	LC122163	583	AH28	Lactarius sp.	/russula-lactarius	93.07	0.0
	POUMMB-33	LC122164	593	AH28	Lactarius sp.	/russula-lactarius	92.07	0.0
	POUMMB-34	LC122165	579	AH30	Thelephora sp.	/tomentella-thelephora	95.85	0.0
	POUMMB-35	LC122166	579	AH30	Thelephora sp.	/tomentella-thelephora	95.94	0.0
	POUMMB-36	LC122167	756	AH35	Boletellus sp.	/boletus	80.18	8,00E-144
	POUMMB-37	LC122168	625	AH40	unspecified Agaricales sp.	unspecified Agaricales	99.68	0.0
	POUMMB-38	LC122169	580	AH56	Tomentella sp.	/tomentella-thelephora	89.64	0.0
	POUMMB-39	LC122170	578	AH57	Tomentella sp.	/tomentella-thelephora	94.46	0.0
	POUMMB-40	LC122171	562	AH61	Boletus sp.	/boletus	89.22	0.0
	POUMMB-41	LC122172	550	AH62	unspecified Agaricales sp.	unspecified Agaricales	93.82	0.0
POUM SI	POUMSI-01	LC122173	565	AH11	Pisolithus sp.	/pisolithus-scleroderma	100.00	0.0
	POUMSI-02	LC122174	565	AH11	Pisolithus sp.	/pisolithus-scleroderma	99.82	0.0
	POUMSI-03	LC122175	565	AH11	Pisolithus sp.	/pisolithus-scleroderma	100.00	0.0
	POUMSI-04	LC122176	565	AH11	Pisolithus sp.	/pisolithus-scleroderma	100.00	0.0
	POUMSI-05	LC122177	564	AH11	Pisolithus sp.	/pisolithus-scleroderma	99.82	0.0
	POUMSI-06	LC122178	579	AH15	Thelephora sp.	/tomentella-thelephora	98.62	0.0
	POUMSI-07	LC122179	579	AH15	Thelephora sp.	/tomentella-thelephora	98.62	0.0
	POUMSI-08	LC122180	579	AH15	Thelephora sp.	/tomentella-thelephora	98.62	0.0
	POUMSI-09	LC122181	578	AH15	Thelephora sp.	/tomentella-thelephora	98.10	0.0
	POUMSI-10	LC122182	610	AH44	Scleroderma sp.	/pisolithus-scleroderma	92.87	2,00E-178



Site reference	ECM DNA ITS sequence code	DDBJ DNA bank accession number	Length sequence (pb)	OTU code	BLAST identification			
					Genus identification	Lineages	% Identity	E-value
POUM SI	POUMSI-11	LC122183	577	AH59	Tomentella sp.	/tomentella-thelephora	90.82	0.0
	POUMSI-12	LC122184	364	AH75	unspecified Ascomycota sp.	unspecified Ascomycota	97.46	6,00E-172
SERP	SERP-01	LC122185	545	AH00	Pisolithus sp.	/pisolithus-scleroderma	99.08	0.0
	SERP-02	LC122186	541	AH00	Pisolithus sp.	/pisolithus-scleroderma	100.00	0.0
	SERP-03	LC122187	541	AH00	Pisolithus sp.	/pisolithus-scleroderma	100.00	0.0
	SERP-04	LC122188	542	AH00	Pisolithus sp.	/pisolithus-scleroderma	100.00	0.0
	SERP-05	LC122189	554	AH00	Pisolithus sp.	/pisolithus-scleroderma	99.46	0.0
	SERP-06	LC122190	541	AH00	Pisolithus sp.	/pisolithus-scleroderma	100.00	0.0
	SERP-07	LC122191	516	AH13	Cortinarius sp.	/cortinarius	91.25	3,00E-171
	SERP-08	LC122192	605	AH13	Cortinarius sp.	/cortinarius	88.42	0.0
	SERP-09	LC122193	605	AH13	Cortinarius sp.	/cortinarius	88.42	0.0
	SERP-10	LC122194	605	AH26	Tomentella sp.	/tomentella-thelephora	97.86	0.0
	SERP-11	LC122195	587	AH52	Tomentella sp.	/tomentella-thelephora	80.00	2,00E-50
	SERP-12	LC122196	576	AH60	Tomentella sp.	/tomentella-thelephora	97.57	0.0
	SERP-13	LC122197	528	AH66	Sebacina sp.	/sebacina	93.37	0.0
	SERP-14	LC122198	456	AH71	unspecified Ascomycota sp.	unspecified Ascomycota	99.12	0.0
	SERP-15	LC122199	406	AH72	Pleiosporales sp.	dotrimideomycetes incertae sedis	89.70	9,00E-151
TIE	TIE-01	LC122200	541	AH00	Pisolithus sp.	/pisolithus-scleroderma	99.63	0.0
	TIE-02	LC122201	541	AH00	Pisolithus sp.	/pisolithus-scleroderma	100.00	0.0
	TIE-03	LC122202	541	AH00	Pisolithus sp.	/pisolithus-scleroderma	100.00	0.0
	TIE-04	LC122203	640	AH04	Boletus sp.	/boletus	99.06	0.0

Site reference	ECM DNA ITS sequence code	DDBJ DNA bank accession number	Length sequence (pb)	OTU code	BLAST identification			
					Genus identification	Lineages	% Identity	E-value
TIE	TIE-05	LC122204	641	AH04	Boletus sp.	/boletus	98.27	0.0
	TIE-06	LC122205	640	AH04	Boletus sp.	/boletus	99.38	0.0
	TIE-07	LC122206	601	AH27	Tricholomataceae sp.	/tricholoma	85.36	1,00E-165
	TIE-08	LC122207	710	AH37	Boletus sp.	/boletus	87.18	1,00E-141
	TIE-09	LC122208	612	AH43	unspecified Agaricales sp.	unspecified Agaricales	95.93	0.0
	TIE-10	LC122209	608	AH45	Boletus sp.	/boletus	84.22	4,00E-96
	TIE-11	LC122210	601	AH47	Russula sp.	/russula-lactarius	94.68	0.0
	TIE-12	LC122211	542	AH63	Pisolithus sp.	/pisolithus-scleroderma	99.44	0.0
VERT	VERT-01	LC122212	599	AH01	Scleroderma sp.	/pisolithus-scleroderma	98.66	0.0
	VERT-02	LC122213	454	AH01	Scleroderma sp.	/pisolithus-scleroderma	100.00	0.0
	VERT-03	LC122214	455	AH01	Scleroderma sp.	/pisolithus-scleroderma	100.00	0.0
	VERT-04	LC122215	572	AH01	Scleroderma sp.	/pisolithus-scleroderma	100.00	0.0
	VERT-05	LC122216	586	AH02	Russula sp.	/russula-lactarius	91.71	0.0
	VERT-06	LC122217	586	AH02	Russula sp.	/russula-lactarius	91.50	0.0
	VERT-07	LC122218	587	AH02	Russula sp.	/russula-lactarius	91.51	0.0
	VERT-08	LC122219	955	AH03	Boletellus sp.	/boletus	82.54	1,00E-152
	VERT-09	LC122220	1029	AH03	Boletellus sp.	/boletus	82.37	7,00E-151
	VERT-10	LC122221	1033	AH03	Boletellus sp.	/boletus	82.02	0.0
	VERT-11	LC122222	1031	AH03	Boletellus sp.	/boletus	82.55	0.0
	VERT-12	LC122223	932	AH03	Boletellus sp.	/boletus	82.14	0.0
	VERT-13	LC122224	858	AH03	Boletellus sp.	/boletus	82.55	0.0

Site reference	ECM DNA ITS sequence code	DDBJ DNA bank accession number	Length sequence (pb)	OTU code	BLAST identification			
					Genus identification	Lineages	% Identity	E-value
VERT	VERT-14	LC122225	1031	AH03	Boletellus sp.	/boletus	83.38	1,00E-162
	VERT-15	LC122226	715	AH07	Phylloporus sp.	/boletus	94.71	0.0
	VERT-16	LC122227	715	AH07	Phylloporus sp.	/boletus	94.99	0.0
	VERT-17	LC122228	714	AH07	Phylloporus sp.	/boletus	95.13	0.0
	VERT-18	LC122229	715	AH07	Phylloporus sp.	/boletus	94.99	0.0
	VERT-19	LC122230	715	AH07	Phylloporus sp.	/boletus	94.99	0.0
	VERT-20	LC122231	580	AH14	Tomentella sp.	/tomentella-thelephora	97.03	0.0
	VERT-21	LC122232	580	AH14	Tomentella sp.	/tomentella-thelephora	97.23	0.0
	VERT-22	LC122233	529	AH14	Tomentella sp.	/tomentella-thelephora	97.54	0.0
	VERT-23	LC122234	591	AH18	Russula sp.	/russula-lactarius	100.00	0.0
	VERT-24	LC122235	591	AH18	Russula sp.	/russula-lactarius	100.00	0.0
	VERT-25	LC122236	537	AH22	unspecified Ascomycota sp.	unspecified Ascomycota	93.55	0.0
	VERT-26	LC122237	583	AH29	Tomentella sp.	/tomentella-thelephora	92.70	0.0
	VERT-27	LC122238	658	AH39	Boletus sp.	/russula-lactarius	88.52	7,00E-149
	VERT-28	LC122239	592	AH50	Russula sp.	/russula-lactarius	96.63	0.0
	VERT-29	LC122240	527	AH67	Tomentella sp.	/tomentella-thelephora	94.00	0.0
WAN	WAN-01	LC122241	534	AH05	Sebacina sp.	/sebacina	91.70	0.0
	WAN-02	LC122242	531	AH06	Sebacina sp.	/sebacina	93.61	0.0
	WAN-03	LC122243	532	AH06	Sebacina sp.	/sebacina	93.43	0.0
	WAN-04	LC122244	531	AH06	Sebacina sp.	/sebacina	93.61	0.0
	WAN-05	LC122245	531	AH06	Sebacina sp.	/sebacina	93.61	0.0

Site reference	ECM DNA ITS sequence code	DDBJ DNA bank accession number	Length sequence (pb)	OTU code	BLAST Identification			
					Genus Identification	Lineages	% Identity	E-value
WAN	WAN-06	LC122246	531	AH06	Sebacina sp.	/sebacina	93.61	0.0
	WAN-07	LC122247	531	AH06	Sebacina sp.	/sebacina	93.61	0.0
	WAN-08	LC122248	538	AH09	Sebacina sp.	/sebacina	96.12	0.0
	WAN-09	LC122249	538	AH09	Sebacina sp.	/sebacina	96.12	0.0
	WAN-10	LC122250	565	AH16	Tomentella sp.	/tomentella-thelephora	96.11	0.0
	WAN-11	LC122251	521	AH16	Tomentella sp.	/tomentella-thelephora	96.35	0.0
	WAN-12	LC122252	525	AH16	Tomentella sp.	/tomentella-thelephora	96.37	0.0
	WAN-13	LC122253	525	AH16	Tomentella sp.	/sebacina	96.37	0.0
	WAN-14	LC122254	554	AH21	Sebacina sp.	/sebacina	90.30	7,00E-168
	WAN-15	LC122255	554	AH21	Sebacina sp.	/sebacina	90.30	7,00E-168
	WAN-16	LC122256	554	AH21	Sebacina sp.	/sebacina	90.30	7,00E-168
	WAN-17	LC122257	619	AH25	Inocybe sp.	/inocybe	88.38	0.0
	WAN-18	LC122258	592	AH49	Tomentella sp.	/tomentella-thelephora	84.81	4,00E-166
	WAN-19	LC122259	580	AH54	Peziza sp.	/peziza	84.04	2,00E-123
WNK	WNK-01	LC122260	579	AH08	Tomentella sp.	/tomentella-thelephora	97.02	0.0
	WNK-02	LC122261	578	AH08	Tomentella sp.	/tomentella-thelephora	97.02	0.0
	WNK-03	LC122262	538	AH09	Sebacina sp.	/sebacina	96.30	0.0
	WNK-04	LC122263	582	AH29	Tomentella sp.	/tomentella-thelephora	91.65	0.0
	WNK-05	LC122264	578	AH31	Tomentella sp.	/tomentella-thelephora	98.27	0.0

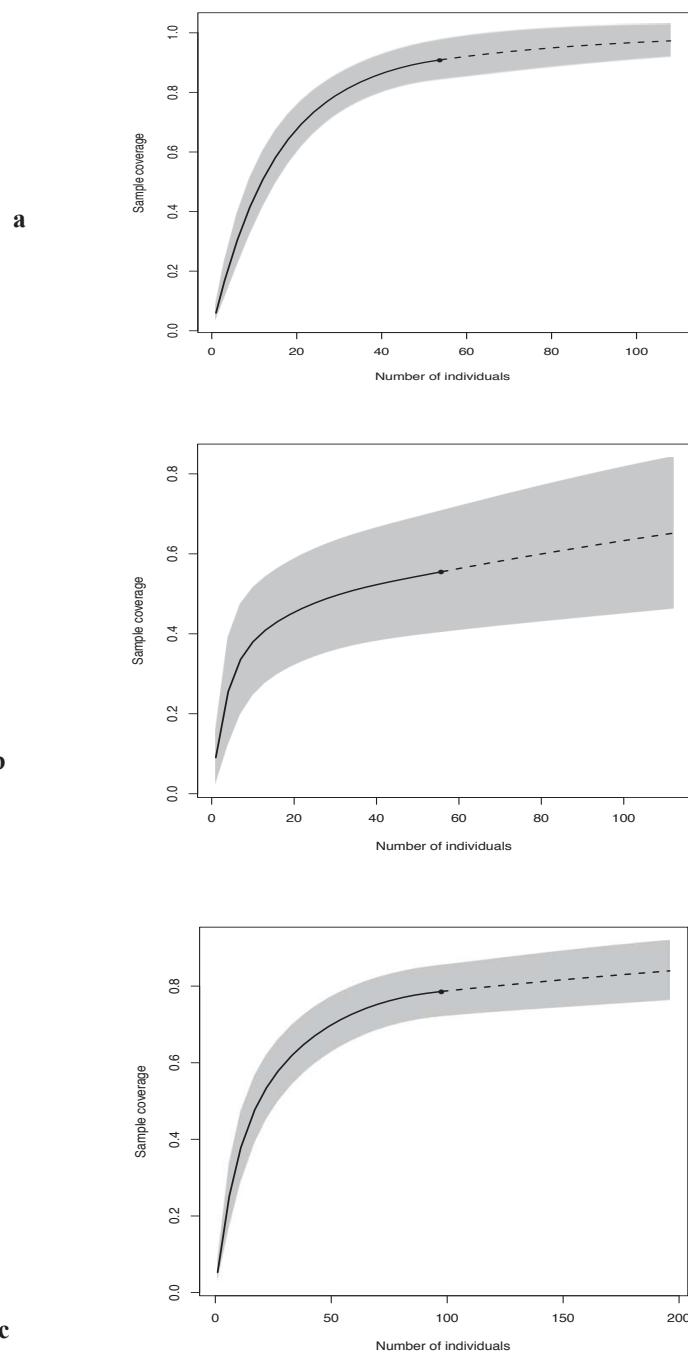
**ESM Table 3:** Results of the Mantel test (100k permutations) for the comparison between the Bray Curtis matrix of the OTU diversity with and without the singletons and the Euclidian matrices of the geochemical parameters including the total element contents in the studied soils.

Matrix	Bray Curtis	
	Total elements	
Euclidian	with singletons	without singletons
<i>r</i>	<i>r</i> = 0.3779	<i>r</i> = 0.3927
<i>p value</i>	<i>p</i> = 0.00494	<i>p</i> = 0.0036

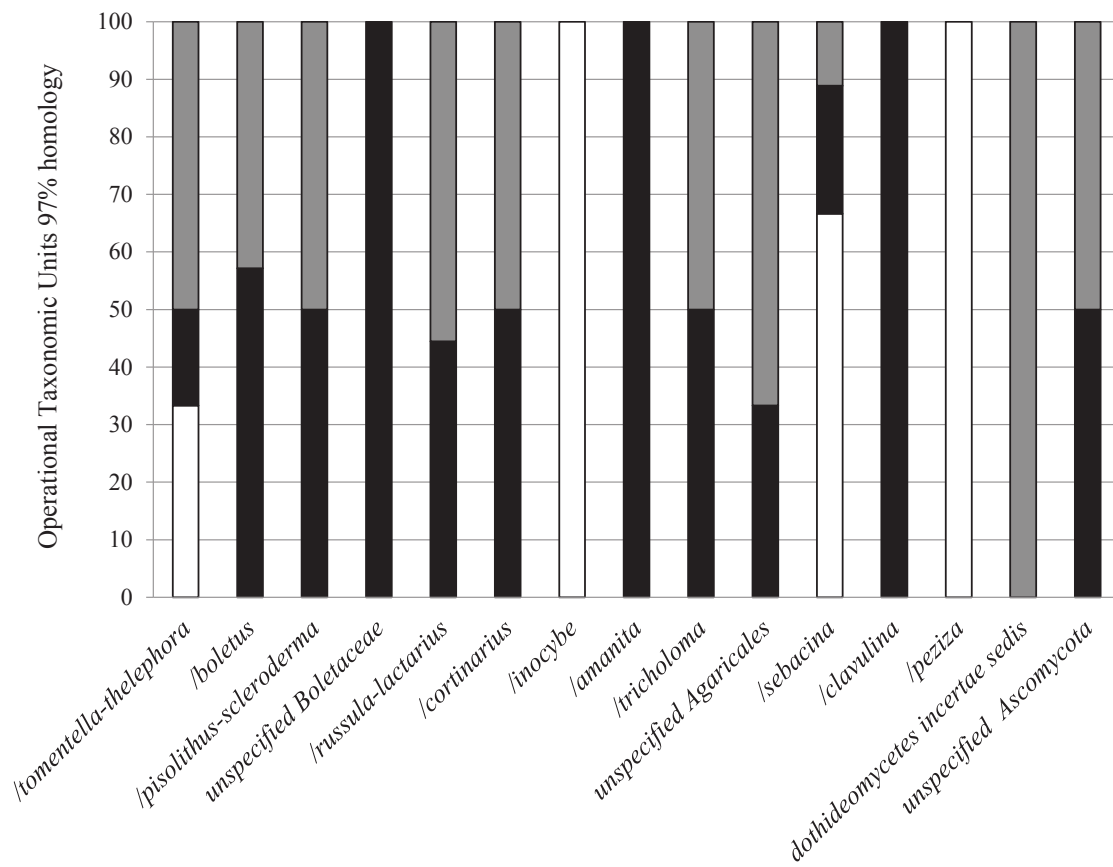
**ESM Table 4:** Results of the Permanova between the Bray Curtis matrix of the OTU diversity with and without the singletons and the Euclidian matrices of the geochemical parameters including the total element contents in the studied soils.

PERMANOVA	Bray Curtis matrix of ECM lineage diversity			
	With singletons		Without singletons	
Geochemical parameters	<i>p</i> value	% of total variation explained	<i>p</i> value	% of total variation explained
pH	0.01127 *	30.1 %	0.01077 *	31.4 %
C/N ratio	0.321	10.7 %	0.3062	11.1 %
Ca	0.01078 *	27.4 %	0.01178 *	28.4 %
Mg	0.863	3.4 %	0.884	2.7 %
K	0.8533	4.2 %	0.8712	3.8 %
P	0.00157 **	43.6 %	0.00169 **	45.5 %
Co	0.02734 *	25.8 %	0.02743 *	26.1 %
Cr	0.06642	19.7 %	0.06923	20.0 %
Fe	0.06039	20.0 %	0.05785	20.8 %
Mn	0.1782	13.2 %	0.1612	13.9 %
Ni	0.06614	19.7 %	0.07041	20.1 %
Na	0.8694	4.7 %	0.9213	3.6 %
Al	0.01618 *	28.3 %	0.01568 *	29.5 %
Si	0.1228	16.1 %	0.1202	16.6 %

\*: significant test at  $p < 0.05$ ; \*\*: significant test at  $p < 0.01$ ; ND: not determined



**ESM Figure 1:** Sample completeness curves indicate sample coverage function of number of individuals sampled for: **a:** calcareous sites; **b:** ferrallitic sites; **c:** volcano-sedimentary sites. The observed interpolated sample completeness is represented with the full line and the estimated extrapolated sample completeness is represented with the dotted line. The grey zone around full and dotted lines represent the 95 % confidence interval.



**ESM Figure 2:** Distribution of the OTUs relative abundance according to fungal lineages and soil categories i.e. calcareous □, ferralitic ■ and volcano-sedimentary ▒.



## Chapitre 2

La plante nurse *Acacia spirorbis* permet-t-elle d'améliorer le développement d'espèce cible par l'enrichissement du sol en microorganismes ?



## Introduction du Chapitre 2

### Objectif :

Afin d'évaluer les capacités de différents topsoils provenant du massif du Koniambo à faciliter l'installation d'espèces ectomycorhiziennes cibles, un essai en pépinière a été mené avec différents topsoils afin de déterminer leurs capacités à améliorer le développement d'espèces cibles et notamment si les champignons ectomycorhiziens qu'ils renferment sont compatibles entre l'espèce nurse *A. spirorbis* et les espèces cibles potentielles. Pour cela une étude de la diversité utilisant une technique de séquençage massif Illumina MiSeq est menée, afin d'estimer au mieux possible la diversité initialement présente et celle qui se met en place.

### Principaux résultats :

Les résultats de ce chapitre font l'objet d'un projet d'article en préparation.

Dans ce travail, nous mettons en évidence la capacité de topsoils à améliorer l'installation de plantes ectomycorhiziennes comparé à un stérile minier, et surtout le potentiel d'*A. spirorbis* à créer du topsoil à fort potentiel symbiotique, et notamment riches en champignons ectomycorhiziens. Lorsque *A. spirorbis* se développe un certain temps sur un sol (entre 5 et 15 ans), il va agir comme un catalyseur et ainsi recréer un écosystème microbiologique dans le sol grâce à ses racines. Ainsi enrichis en ectomycorhizes, ce sol devient un excellent substrat pour améliorer la mise en place d'espèces de restauration écologiques. Ces améliorations se traduisent par : un meilleur développement des plants et à un enrichissement des communautés ectomycorhiziennes associées aux racines. Les racines des jeunes semis ont pu facilement se faire inoculer par les ectomycorhizes présente dans le sol, qui a lui-même été préalablement enrichi par *A. spirorbis*. Ces améliorations sont également visibles avec un topsoil prélevé sous *T. guillainii*, un sol qui n'a jamais été impacté par l'activité minière comparé à celui issu des plantations d'*A. spirorbis*, et pourtant l'effet est mais nettement inférieur. Il ressort également de cette étude que les *Thelephoraceae* sont une fois de plus dominant, ils constituent les fondations de la diversité ectomycorhizienne qui se met en place sur les racines des plants cibles.

**Conséquences pour l'itinéraire technique :**

Ces résultats nous permettent d'envisager l'utilisation d'*A. spirorbis* en restauration écologique des sites miniers dégradé. En effet, à ce stade, nous proposons l'utilisation d'*A. spirorbis* comme plante outil pour recréer un topsoil riche en champignons ectomycorhiziens diversifiés, compatibles avec les espèces cibles et des conditions environnementales favorables à l'implantation des espèces cibles de la restauration écologique. La prochaine étape consiste à réaliser des essais sur le terrain, pour valider les différentes étapes de cet itinéraire et de mettre en place des indicateurs de suivi de la réussite du processus de restauration écologique.

**Article 2: Caractérisation des potentiels ectomycorhiziens des sols et des topsoils pour la restauration écologique d'un site dégradé assisté par le système plante nurse/plantes cibles**

**Auteurs :** Anne HOULES<sup>1,2</sup>, Frédérique Mahé, Bryan VINCENT<sup>4</sup>, Laurent BORDEZ<sup>3</sup>, Laure HANNIBAL<sup>4</sup>, Magali PATROIS<sup>2</sup>, Laurent VEDF<sup>2</sup>, Philippe JOURAND<sup>4</sup>, Marc DUCOUSSO<sup>5\*</sup>

**Affiliations :**

<sup>1</sup>CIRAD, UMR082 LSTM, F-34398 Cedex 5, Montpellier, France

<sup>2</sup>Koniambo Nickel SAS, Vavouto, BP 679, 98860 Koné, Nouvelle-Calédonie

<sup>3</sup>Institut Agronomique néo-Calédonien (IAC), Axe 2, 98800 Nouméa, Nouvelle-Calédonie

<sup>4</sup>IRD, UMR040 LSTM, NC-98848 Nouméa Cedex, Nouvelle-Calédonie

<sup>5</sup>CIRAD, Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, IRD/INRA/CIRAD/Montpellier SupAgro/Université Montpellier, TA10C, 34398 Montpellier Cedex 5, France

**Auteur pour correspondance\*:**

marc.ducouso@cirad.fr

Tel: +33 (0)7 82 01 61 06

## Résumé

La restauration écologique des sites dégradés nécessite des solutions innovantes, notamment en Nouvelle-Calédonie un hot spot de biodiversité où des contraintes édaphiques fortes ont conduit à l'échec de beaucoup d'essais de revégétalisation. Ainsi des itinéraires techniques fondés sur la facilitation entre plantes utilisant le système plante nurse/plantes cibles sont testés avec l'utilisation des topsoils. Pour maîtriser ces itinéraires, nous avons caractérisés par séquençage Illumina la diversité des champignons ectomycorhiziens présents dans un écosystème de référence et dans des plantations de l'espèce nurse puis la capacité de leur topsoils à permettre la formation d'ectomycorhizes avec des espèces pièges. Dans l'écosystème de référence dominé par *Tristaniopsis guilainii*, 184 OTUs réparties en 16 lignées ont été observés et 100 OTUs réparties en 12 lignées dans les plantations de l'espèce nurse, *Acacia spirorbis* ; 42 OTUs sont communes à ces deux espèces. Le potentiel ectomycorhizogène des topsoils prélevés sous *T. guilainii* (TG), *A. spirorbis* (AS) dans un maquis ligno-herbacé (LH), un maquis para-forestier (PF) et un stérile minier (SM) ont été révélés avec *A. spirorbis* et *Eucalyptus terreticornis*. Après 14 mois, le nombre d'OTUs observés dans les topsoils LH, PF et SM est compris entre 17 et 32 ; entre 40 et 66 dans les topsoils TG et entre 70 et 72 dans les topsoils AS. Les topsoils créés par *A. spirorbis* permettent l'établissement d'une communauté ectomycorhizienne significativement plus riche que les autres topsoils et potentiellement compatible avec des myrtaceae endémiques du maquis minier calédonien comme *Tristaniopsis* spp.

**Mots clés :** Ectomycorhizes ; Topsoils ; Restauration écologique ; Facilitation ; ITS fongiques ; Illumina

## Introduction

Si la revégétalisation des milieux extrêmes reste encore très difficile, la restauration écologique de ces milieux tel que défini par la Society for Ecological Restoration : « une action intentionnelle qui initie ou accélère l'autoréparation d'un écosystème dégradé, endommagé ou détruit, en respectant sa santé, son intégrité et sa gestion durable » (SER, 2004) n'est encore aujourd'hui qu'une perspective. Afin de développer des itinéraires techniques pour la restauration écologique des maquis miniers néo-calédoniens après exploitation, des recherches en partenariat avec les services « environnement » des sociétés minières ont été développées. Dans ce cadre, l'accent a rapidement été mis sur l'utilisation des sols de surface en interaction avec les systèmes racinaires des plantes, ou topsoil et sur l'identification des plantes pionnières pour permettre la revégétalisation primaire des sites dégradés par les activités minières.

Dans une étude précédente, Bordez et al. (2016) ont décrit la diversité des topsoils du massif du Koniambo. Ces auteurs ont montrés que les compositions des cortèges microbiens étaient différentes en fonction notamment de la végétation d'origine avant l'extraction du topsoil. Ensuite, parmi les espèces pionnières identifiées, une espèce couramment utilisée en restauration écologique en Nouvelle-Calédonie, *Acacia spirorbis* ssp. *spirorbis* Labill. a retenu notre attention pour ses capacités à croître en plantation de revégétalisation dans les stériles miniers (L'Huillier et al., 2010). Par ailleurs, cette espèce a la capacité de se développer sur une grande variété de sol dont les sols ferralitiques (Houlès et al., 2017).

Sur le massif du Koniambo, les zones d'extraction du minerai de nickel sont majoritairement et naturellement recouvertes de maquis arbustifs dominés par des espèces du genre *Tristania* associées à une large diversité d'espèces endémiques pour la plupart (Perrier et al., 2006). Les plantations en plain des espèces de ce genre et des espèces endémiques maîtrisées en pépinière ont systématiquement conduit à l'échec des plantations. Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer ces échecs, notamment celle d'une croissance initiale beaucoup trop lente pour juguler l'érosion et accéder à des ressources en eau suffisantes pour passer les caps des périodes de sécheresse.

Ce constat nous a conduit à proposer un itinéraire technique pour la restauration écologique de ces maquis fondés sur la facilitation entre espèces. La facilitation entre plantes a été décrite comme une situation où la

présence d'une espèce améliore l'installation, la vie ou la survie d'une ou d'autres espèces sans causer de dommages à aucunes des espèces. La facilitation est d'autant plus importante que l'écosystème présente des contraintes environnementales fortes. Ainsi, sur les stériles miniers à revégétaliser qui présentent des contraintes édaphiques extrêmes, on peut raisonnablement faire l'hypothèse que la facilitation aura une place importante dans les rapports entre espèces végétales. A ce stade, nous proposons donc d'initier la restauration écologique par la mise en place d'un système plant nurse/plantes cibles où l'installation de la plante nurse facilitera l'établissement des plantes cibles de la restauration. Il est à noter que dans ce système, la plante nurse mise en place initialement n'a pas vocation à subsister dans l'écosystème restauré.

Nous connaissons également l'importance des microorganismes symbiotiques, notamment des ectomycorhizes pour la survie et de développement des plantes dans ces milieux extrêmes. Ainsi, le rôle de *Pisolithus albus* (Cooke & Massee) Priest dans la croissance d'*Eucalyptus globulus* Labill. et d'*A. spirorbis* a été montré expérimentalement (Jourand et al., 2014). Afin d'optimiser les conditions de plantation de l'espèce nurse, *A. spirorbis*, dans un premier temps, nous avons cherché à caractériser la capacité de différents topsoils et substrat à permettre l'établissement d'ectomycorhizes diversifiées et la croissance de deux espèces de plantes pièges. Pour cela, 4 types de topsoils et un stérile minier récoltés sur le massif du Koniambo ont été placés en pépinière dans des terrines et semés avec *E. terreticornis* Sm ou *A. spirorbis*. Après une phase de croissance de 14 mois où la croissance en hauteur des semis est mesurée régulièrement, les plants ont été déposés afin de mesurer les biomasses racinaires et aériennes produites dans ces différents traitements et également de caractériser la diversité des champignons ectomycorhiziens présents dans les systèmes racinaires de ces deux espèces.

## **Matériels et méthodes**

### ***Prélèvements des topsoils, du stérile minier utilisés et mis en culture des plants***

Les sols étudiés provenaient tous du massif du Koniambo, situé en Province Nord de la Nouvelle-Calédonie et exploité pour sa richesse en minerai de nickel.

Des topsoils provenant de : - 3 formations naturelles dominées par *Tristaniopsis guillainii* Viell. Ex Brongn. & Gris : TG1, TG2 et TG3 (Table 1) ; - 3 plantations d'*A. spirorbis* âgées de 10 à 20 ans, ces plantations



avaient été mises en place sur stérile minier, dans le cadre d'opération de revégétalisation du maquis décapé par l'activité minière : AS1, AS2 et AS3 (Table 1) ; - 2 verses de stockage de topsoils, une rassemblant un mélange de topsoils issus de maquis para-forestier riche en débris végétaux et matière organique (PF), l'autre rassemblant un mélange de topsoils issus de maquis ligno-herbacé moyennement riche en débris organiques (LH). Enfin, nous avons aussi testé un stérile minier composés de sols grattés sous les couches de topsoil qui en conséquent sont pauvres en matières organique et en microorganismes (SM). Soit un total de 9 substrats différents.

**Table 1** : Description et localisation des sites.

Classe de sols	Description du site et du sol	Site	Localisation
<b>Sols à <i>A. spirorbis</i> (AS)</b>	Sols prélevés au pied d' <i>A. spirorbis</i> provenant de plantations réalisé sur d'anciens maquis ligno-herbacé impactés par l'activité minière	AS1	21° 00' 41,72" S ; 164° 50' 16,72" E
		AS2	21° 00' 20,88" S ; 164° 50' 18,42" E
		AS3	21° 00' 37,13" S ; 164° 49' 44,36" E
<b>Sols à <i>T. guillainii</i> (TG)</b>	Sols prélevés au pied de <i>T. guillainii</i> en maquis arbustifs naturels non impactés par l'activité minière	TG1	20° 59' 52,11" S ; 164° 47' 26,89" E
		TG2	21° 00' 20,54" S ; 164° 50' 18,45" E
		TG3	21° 00' 37,13" S ; 164° 49' 44,36" E
<b>Sols de verses (SV)</b>	Sol minier dit « stérile » composés de sols grattés sous les couches de topsoils	SM	20° 59' 50,97" S ; 164° 47' 26,84" E
	Topsoils de végétation para-forestière	PF	20° 58' 19,86" S ; 164° 47' 37,08" E
	Topsoils de végétation ligno-herbacé	LH	20° 59' 18,66" S ; 164° 49' 02,22" E

Pour chaque substrat, 5 prélèvements ont été effectués puis homogénéisés sur place avant d'être conditionnés dans des sacs pour être transporté à la pépinière où ils ont été directement mis en terrine de 40 X 60 cm. Des semis avec deux espèces ectomycorhiziennes : *E. terreticornis* une myrtacée et *A. spirorbis* ont alors été réalisés. Trois répétitions ont été faite pour chacune des modalités testées soit 9 (substrats) X 2 (espèces) X 3 répétitions = 54 terrines. Les semis ont bénéficié d'un arrosage régulier sans amendement ni traitement (fertilité ou biocides) pendant 14 mois en pépinière. La hauteur des 10 plants d'*E. terreticornis* et d'*A. spirorbis* les plus grands de chaque terrine est mesurée toute les trois semaines, pendant 14 mois. A l'issue de cette période, la totalité des plants de chaque terrine et chaque espèce est récoltée et comptée. Les parties aériennes sont séparées des parties racinaires puis mises à sécher 72 h à 60°C afin d'obtenir les masses sèches. Les terrines présentant moins de 5 plants au total n'ont pas été prises en compte pour l'étude.

La corrélation entre la biomasse aérienne et racinaire et également entre la biomasse total par plant et la croissance moyenne journalière de la hauteur par plant est évaluée avec un test de Spearman réalisé avec l'algorithme « cor.test » du package R « stats ». Des boîtes à moustaches représentant les biomasses aériennes et racinaires et la croissance moyenne journalière de la hauteur des plants en fonction du sol permettent d'évaluer l'effet du sol sur le développement des plants. Ces représentations graphiques sont appuyées d'un test de Kruskal Wallis réalisés avec l'algorithme « kruskal.test » du package R « stats ».

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R (R Development Core Team, 2011).

### ***Analyse des substrats***

Une analyse géochimique des substrats a été réalisée par le Laboratoire d'analyse des sols, eaux et matériel végétal du CIRAD à Montpellier. Afin de définir quels composants géochimiques définissent les sols sélectionnés, une Analyse en Composantes Principales (ACP) a été réalisée avec l'algorithme « dudi.pca » du package R « ade4 » (Daniel Chessel et Anne-Béatrice Dufour) sur les données moyennes de pH, de disponibilité en eau, du ratio C/N, de la matière organique et des éléments totaux.

### ***Echantillonnage et analyses des racines ectomycorhizées***

A l'issue des 14 mois de culture à la pépinière de KNS à Voh (Nouvelle-Calédonie), des racines ectomycorhizées sont prélevées en 10 point différents du chevelu racinaire formé par l'ensemble des plants dans chaque terrine. Ces racines sont placées, le temps du transport, dans une solution à 2 % de cetyltriméthylammoniumbromide (CTAB), de 100 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 1,4 M NaCl et 20 mM d'EDTA, puis elles sont conservées à -20°C jusqu'à l'isolement des ectomycorhizes. La totalité des ectomycorhizes est isolée du reste du chevelu racinaire à la loupe binoculaire et à nouveau lavée à l'eau milliQ pour les débarrasser d'éventuelles traces de sol et du CTAB en vue de l'analyse moléculaire.

### ***Analyse moléculaire de la diversité des champignons ectomycorhiziens***

L'ADN total des ectomycorhizes prélevé dans 52 terrines (2 substrats n'ont pas permis la croissance d'*E. terreticornis*) a été extrait avec le kit d'extraction DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Courtabœuf, France) suivant le protocole décrit par (Jourand et al., 2010). Le séquençage des ITS2 fongiques a ensuite été réalisé par une technique de séquençage massif, IlluminaSeq afin d'optimiser la diversité des séquences observées. Ce séquençage a été sous-traité à l'Unité AGAP du Cirad à Montpellier. Ainsi, une première PCR va permettre d'amplifier un fragment d'ADN correspondant à la région ITS2 comprenant une partie des régions 5,8S et 28S de l'opéron ribosomique, fragment qui sera ensuite amplifiée avec les amorces fITS7\_Plage (5'-CTTTCCTACACGACGCTCTCCGATCT|GTGARTCATCGAATCTTTG-3') et ITS4\_Plage (5'-GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT|TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Ihrmark et al., 2012). La partie 5' de ces amorces correspond à la séquence complémentaire des fragments présents à la surface du flowcell et permettent de fixer de façon covalente la région à séquencer. La réaction de PCR utilisée pour cette amplification est préparée avec 1 µL d'ADN dilué au 1/20<sup>ème</sup>, 10 µM de chaque amorce, 25 µL de MasterMix Phusion GC buffer et compléter avec de l'eau milliQ ultra pure à raison d'un volume qsp de 50 µL. L'amplification suit ensuite le programme suivant : un cycle de dénaturation d'initiale de 30 secondes à 98°C, 27 cycles d'élongation de 10 secondes à 98°C, 30 secondes à 60°C et 45 secondes à 72°C, puis d'un cycle d'extension finale de 7 minutes à 72°C. Les produits PCR ainsi obtenus sont purifiés avec des billes

magnétiques CleanPCR (MagBio Genomics, Inc.) et repris dans 30 µL avec un ratio de 0,7 X pour les fragments supérieurs à 300 pb ou de 0,8 X pour les fragments entre 200 et 300 pb. Ils sont ensuite normalisés de façon à obtenir une solution finale à 5 ng/µL. La seconde PCR d'enrichissement et d'indexage est réalisée avec : 1 µL dilué au 1/10<sup>ème</sup> du produit PCR purifié et normalisé, soit 0,5 ng, 1 µL d'amorce InPE 1.0 (5'AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT 3') à 25 µM, 1 µL d'amorce InPE 2.0 (5' GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT 3') à 0,5 µM, 1 µL d'amorce InPE/WoLB #XX (ESM Table 2) à 25 µM (amorces d'indexage), 21 µL d'eau milliQ ultra pure et 25 µL de Phusion PCR master Mix GC buffer. L'amplification suit ensuite le programme suivant : un cycle de dénaturation d'initiale de 30 secondes à 98°C, 18 cycles d'élongation de 10 secondes à 98°C, 30 secondes à 65°C et 45 secondes à 72°C, puis d'un cycle d'extension finale de 5 minutes à 72°C. Les produits de la PCR d'indexage sont utilisés pour la construction des librairies à 12 pM final suivant le protocole Denature and Dilute Libraries Guide de MiSeqSystem (part 15039740 vol01, January 2016) et normalisés suivant le Protocole A : Standard Normalization Method. Enfin les librairies d'ADN sont séquencées en 2 x 250 pb sur un séquenceur Illumina MiSeq suivant le protocole MiSeq System User Guide de MiSeqSystem (part 15027617).

### ***Analyse des données de séquençage massif, IlluminaSeq***

Les données ont été analysées comme décrit par F. Mahé sur le « Fred's metabarcoding pipeline ». La première étape consiste à réaliser des contigs avec les séquences obtenues avec le logiciel Paired-End reAd mergeR (PEAR) (Exelixis Lab), suivi d'une étape de demultiplexing visant à séparer les séquences et à les réassocier à l'échantillon d'origine grâce aux adaptateurs utilisés pour les reconnaître, puis les régions correspondantes aux amorces et aux TAG sont enlevées avec le logiciel Cutadapt© (Martin, 2010). L'étape suivante a permis de regrouper les séquences identiques avec les micro-variants qui correspondent au bruit de fond et ainsi obtenir des Unités Taxonomiques Operationelles (OTUs) ; cette étape est réalisée avec l'algorithme « Swarm » qui utilise une méthode de haute précision basée sur une différenciation par couche utilisant un seuil localisé au nucléotide près (d=1). La dernière étape va consister à éliminer les séquences qui ont été générée artificiellement au cours des PCR, que l'on appelle « chimères », cette étape est réalisée avec VSEARCH.

Enfin parmi les OTUs propres ainsi obtenues, les singletons (OTU représentées par une seule séquence) sont éliminés et les OTUs restantes sont assignées avec l'algorithme MassBlaster de PlutoF à une espèce existante avec un seuil de similarité permettant de ne garder que les espèces fongiques grâce à la base de données Unite (Abarenkov et al., 2010). Les OTUs identifiées sont ensuite regroupées selon les lineages identifiés comme ectomycorhiziens (Tedersoo et al., 2010 ; Henry et al. 2016).

### ***Analyse de la diversité fongique en fonction de la composition des sols et de la plante piège***

La qualité et la suffisance de l'échantillonnage sont évaluées avec les indices de diversité observés et estimés jusqu'à l'asymptote de : la richesse spécifique  $^{\circ}D$  qui permet de compter les taxons sans prendre en compte leur abondance relative, l'indice de diversité de Shannon  $^1D$  qui comptabilise les taxons en proportion de leur abondance et de l'indice de diversité de Simpson  $2D$  qui mesure la probabilité que deux individus sélectionnés au hasard appartiennent à la même espèce. Ces indices sont calculés avec les algorithmes « ChaoRichness », « ChaoShannon » et « ChaoSimpson » du package R « Inext » (Hsieh et al., 2016). Des représentations graphiques montrent la répartition des lineages fongiques identifiés sur la totalité de l'échantillonnage sous forme de camemberts, ainsi que le statut mycorhizien des champignons et la composition des lineages selon l'espèce hôte et le sol sous formes d'histogrammes en barres cumulées.

L'influence des composants des sols sur la diversité est évaluée avec un test de Mantel basé sur la corrélation de Pearson avec l'algorithme « vegdist » du package R « vegan » (Jari Oksanen) (Chao et al., 2005).

Des tests Chi2 d'indépendance réalisés avec l'algorithme « chisq.test » du package R « stats » permettent de comparer deux à deux les communautés des lineages ectomycorhiziens des sols sélectionnés pour les arbres originaires des sites sélectionnés et pour les plants développés sur ces mêmes sols. Des Chi2 sont également réalisés pour comparer les communautés ectomycorhiziennes des arbres en milieu naturel avec celles obtenus sur les plants développés sur un même sol. Une troisième série de Chi2 est réalisée pour comparer les communautés ectomycorhiziennes entre les plants d'*E. terreticornis* et d'*A. spirorbis* développés en pépinière sur les sols sélectionnés. Ces calculs sont appuyés de diagrammes de Venn réalisés avec Venny 2.1 afin de mettre en évidence les OTUs partagés entre les traitements comparés.

Une analyse Non-metric Multidimensional Scaling (NMDS) va permettre de représenter sur deux dimensions la répartition des lineages ectomycorhiziens en fonction des sols et de leurs composants géochimiques. Cette analyse a été réalisée avec l'algorithme « metaMDS » du package R « vegan » (Jari Oksanen).

Enfin, l'influence individuelle des composants géochimiques des sols sur la diversité ectomycorhizienne est évaluée avec une analyse de la variance par permutation (Permanova) entre la matrice Bray-Curtis de la diversité ectomycorhizienne des OTUs et les matrices Euclidiennes des paramètres géochimiques des sols. Cette analyse a été réalisée avec l'algorithme « perm.anova » du package R « RVAideMemoire » (Maxime Hervé).

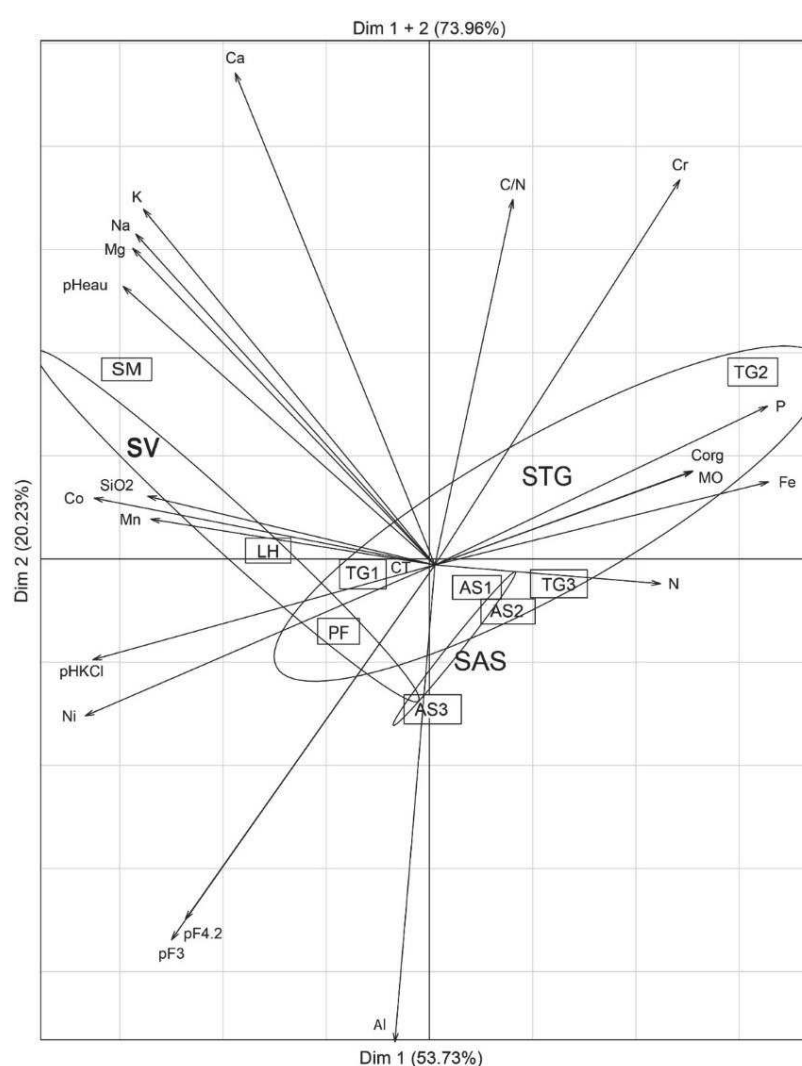
## Résultats

### *Principales caractéristiques des substrats utilisés*

Le détail des analyses géochimiques est présenté dans ESM Table 1. Les substrats les plus riches en matières organiques sont les topsoils prélevés sous *T. guillainii* (TG) avec des teneurs variables de 2 à 3,4 %. Pour les autres substrats (AS, PF, LH) sauf le stérile minier, les teneurs en matières organiques sont variables de 1 à 2 %. Le stérile minier (SM) présentent une teneur en matière organique inférieure à 1 %. Concernant le carbone organique, les teneurs varient de la même façon avec respectivement des teneurs entre 1,32 % et 1,96 % pour les TG ; entre 0,7 et 1,13 % pour AS, PF et LH. Pour SM la teneur est de seulement 0,52 %. Pour l'azote total encore un constat similaire, les sols TG présentent tous des teneurs entre 0,6 et 0,9 %, les autres sols sont entre 0,3 et 0,54 %. Le stérile minier a la teneur la plus faible avec 0,22 %. Les topsoils de verse (PF et LH) ont les plus hautes valeurs de disponibilité en eau avec des pF3 proches de 29. Concernant la calcimétrie et le pH, SM se distingue des autres avec un pH(KCl) de 6,9 le plus élevé et TG2 par la valeur la plus faible à 4,7, pour les autres sols les teneurs sont proches de 6. Concernant le pH, les topsoils AS ont des pH entre 5,4 (AS3) et 5,7 (AS2), les topsoils TG entre 5,4 (TG2) et 5,9 (TG1). Pour les topsoils de verse, PF et LH, le pH est de 6. Il est de 7 pour SM.

La Figure 1 présente l'ACP regroupant les principales données géochimiques avec les sols évalués. Il apparait de cette analyse que les 3 sols à *A. spirorbis* AS1, AS2 et AS3 sont relativement proches en terme de

composition géochimiques, mais ne sont pas définies par un élément en particulier, à part une légère corrélation avec l'azote et le carbone total. A la différence des sols à *T. guillainii* (TG) qui sont nettement plus dispersés de par leur composition géochimique. En effet TG1 apparaît comme un sol riche en carbone total, tandis que c'est l'azote qui définit TG3 et pour TG 2 le phosphore, le carbone organique, la matière organique et le fer. Pour les sols de vers, ils sont également très dispersés sur l'ACP, PF apparaît corrélé au carbone total, ainsi que légèrement au nickel et au pH(KCl), LH est aussi lié au carbone total et légèrement à la silice, au cobalt et au manganèse, tandis que SM est plutôt corrélé au pH, au magnésium, au sodium et au potassium.



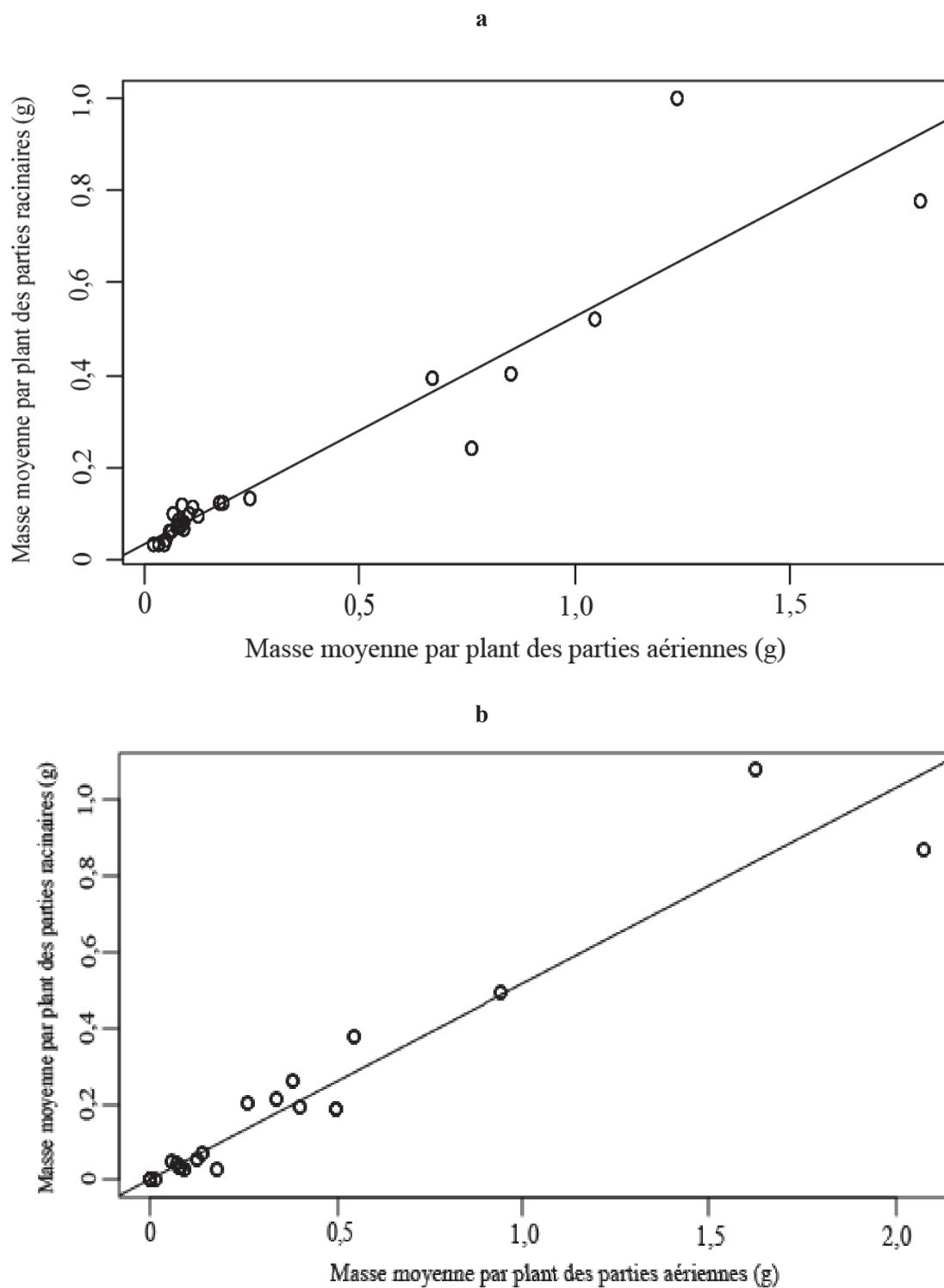
**Figure 1** : Contribution des différentes variables mesurées à l'élaboration des axes 1 et 2 pour l'Analyse en Composantes Principales : pH, disponibilité en eau, ratio C/N éléments totaux des 3 classes de substrat : SAS : topsoils à *A. spirorbis* ; STG : topsoils à *T. guillainii* ; SV : substrats de vers.

### ***Croissance et biomasses des plants en fonction des substrats***

Les semis d'*E. terreticornis* ne se sont pas développés sur SM et LH toutes répétitions confondus, ils sont pris en compte dans la suite de l'étude car les graines s'étant développé de façon très satisfaisante sur les reste des sols et les répétitions ayant été randomisées dans la disposition des bacs de semis, la qualité des lots de graines utilisés et du dispositif peut difficilement être mis en cause.

Les p-values du test de Spearman entre biomasses des parties aériennes et racinaires pour *E. terreticornis* et *A. spirorbis* apparaissent comme non significatives au risque de 5 % (Table 2.a). Ainsi biomasses aériennes et racinaires sont corrélés avec des taux de corrélation proche de 95 % pour les deux espèces. Il n'y a donc pas d'influence significative du substrat sur la répartition de la biomasse dans la plante. Cette corrélation est illustrée par une droite de régression présentée Figure 2.





**Figure 2 :** Droite de régression de la biomasse moyenne par plant entre les parties aériennes et racinaires sur les plants après 14 mois de développement : **a** : *A. spirorbis* ; **b** : *E. terreticornis*

**Table 2 :** Taux de corrélation de Spearman : **a.** entre la biomasse moyenne des parties aériennes et racinaires des plants après 14 mois de développement. Hypothèse : les paramètres biomasse parties aériennes et racines ne sont pas corrélés ; l'hypothèse est rejetée au risque 5% ; **b.** entre la biomasse totale moyenne et de la croissance journalière moyenne de la hauteur des plants après 14 mois de développement. Hypothèse : les paramètres biomasse totale et croissance de la hauteur ne sont pas corrélés ; l'hypothèse est rejetée au risque 5%.

<b>a</b>		
	<i>A. spirorbis</i>	<i>E. terreticornis</i>
<b>p-value</b>	< 2,2e-16	< 2,2e-16
<b>Rho (taux de corrélation)</b>	0,9401709	0,9445472

<b>b</b>		
	<i>A. spirorbis</i>	<i>E. terreticornis</i>
<b>p-value</b>	< 2,2e-16	< 2,2e-16
<b>Rho (taux de corrélation)</b>	0,9120005	0,8611066

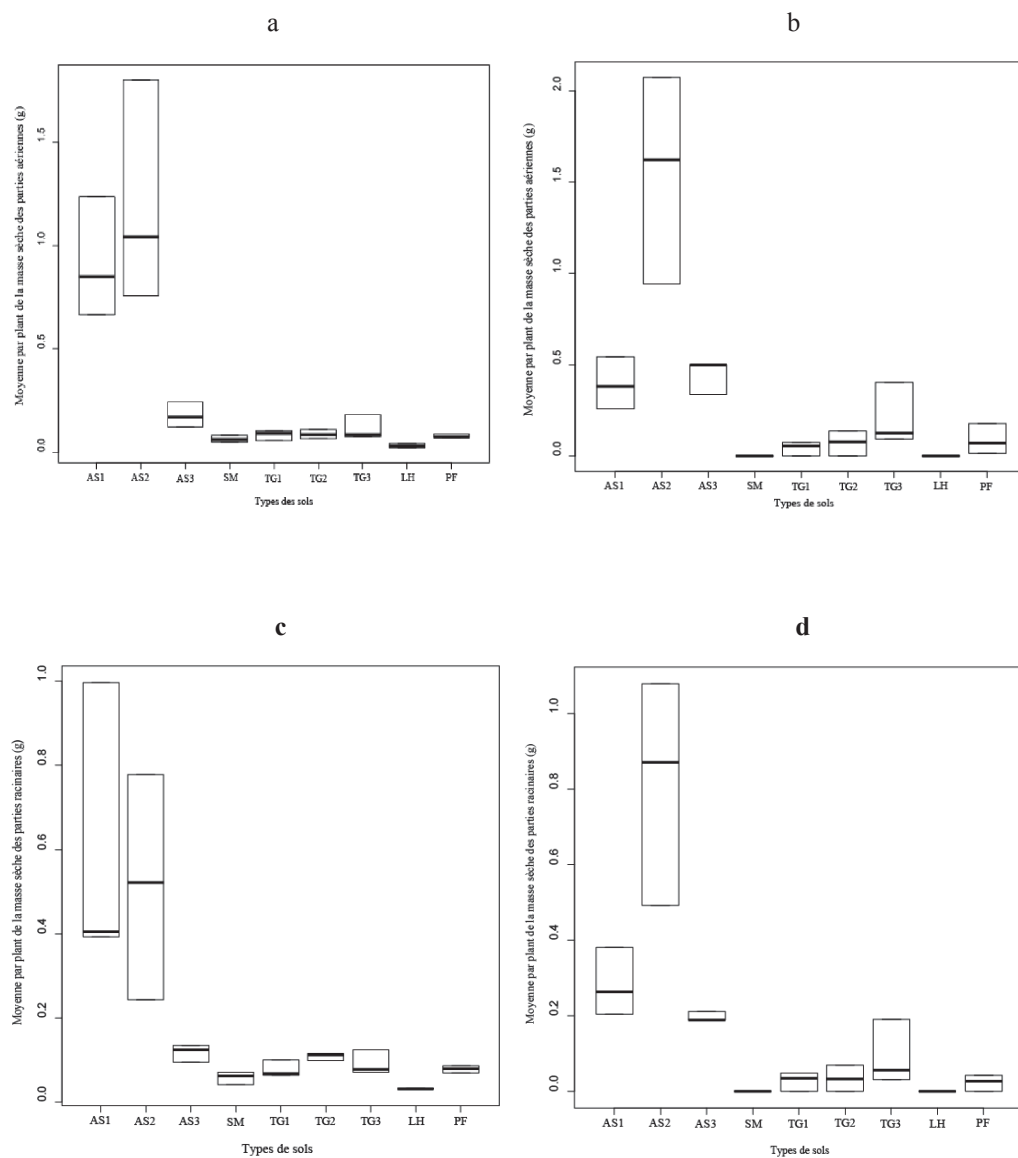
Un autre test de Spearman entre biomasse total moyenne et croissance journalière moyenne de la hauteur des plants présentes des p-values non significatives au risque de 5 % avec des taux de corrélation calculé qui varie entre 91 et 86 % pour les deux espèces (Table 2.b). On considère donc que les paramètres croissance journalière moyenne de la hauteur et biomasse totale moyenne sont corrélés.

Pour les plants d'*A. spirorbis* sur les topsoils AS1 et AS2 on constate des biomasses aériennes moyennes avoisinant les 1,0 g et 0,4 et 0,5 g pour les biomasses racinaires (Figure 3a) alors que ces biomasses sont en moyenne respectivement de 0,2 g et 0,15 g pour les autres substrats. Concernant la croissance journalière moyenne de la hauteur, elle atteint approximativement 0,08 mm/jour pour AS1 et AS2, suivi d'AS3 avec environ 0,04 mm/jour et des croissances situées entre 0,02 et 0,036 mm/jour pour les autres substrats. La croissance la plus basse est celle sur SM avec une croissance proche de 0,02 mm/jour (Figure 4a).

Pour les plants d'*E. terreticornis* c'est notamment ceux développés sur AS2 qui se distinguent avec une biomasse aérienne moyenne d'approximativement 1,6 g contre des masses moyennes de l'ordre de 0,5 g pour

AS1 et AS3 et valeurs inférieures à 0,2 g pour les autres sols (Figure 3c). Les plants sur LH et SM ne s'étant pas développés, leur biomasse est considérée comme nulle. Pour la croissance journalière moyenne de la hauteur, les plants sur AS2 atteignent une moyenne d'environ 0,075 mm/jour, suivi d'AS1 (environ 0,06 mm/jour), AS3 (0,05 mm/jour), TG3 (0,045 mm/jour), TG1, TG2 et PF (entre 0,02 et 0,04 mm/jour) et des croissances nulles pour SM et LH où très peu de plants se sont développés un temps pour de mourir avant la fin de l'expérience. (Figure 4b).

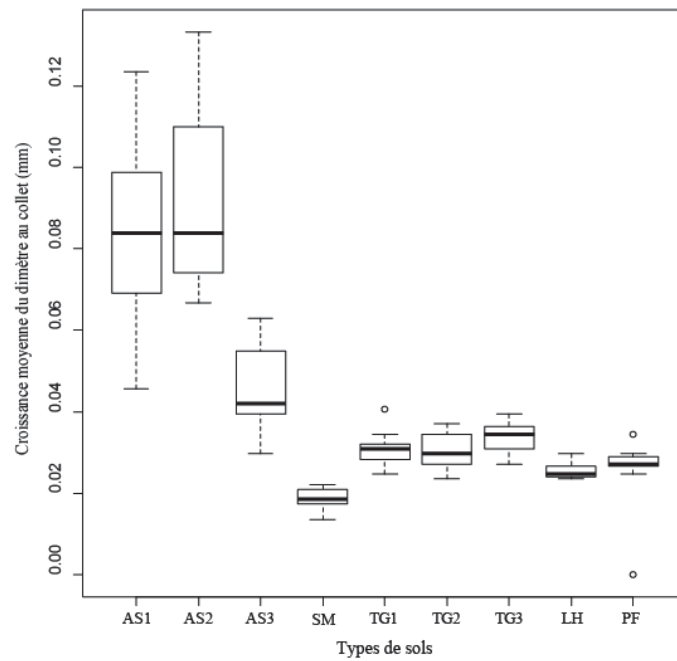
Ces résultats sont appuyés par un test de Kruskal-Wallis entre la croissance journalière moyenne de la hauteur et le type de sol avec des p-values inférieures à  $2,2 \cdot 10^{-16}$  pour les deux espèces de plants semés, donc non significatives au risque de 5 %. Le substrat a donc une influence significative sur le développement des plants.



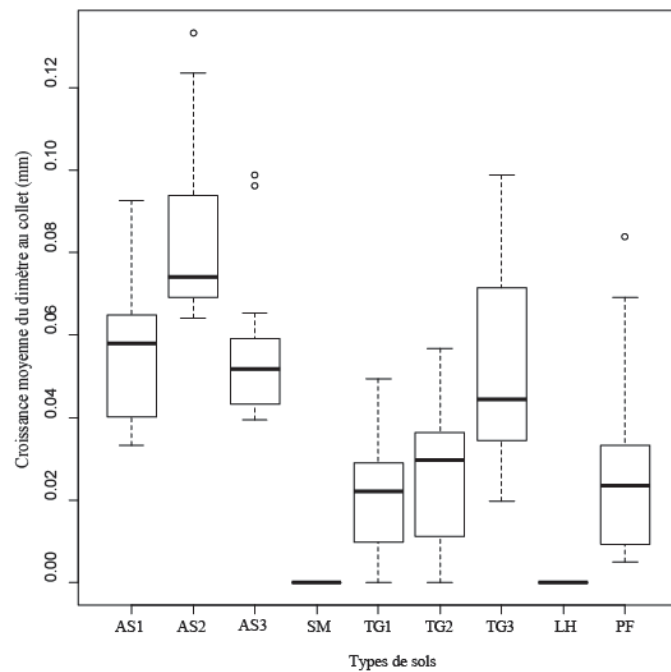
**Figure 3:** Masse sèche moyenne des parties aériennes par plant, 14 mois après semis en fonction des différents types de substrat ; **a** : des plants d'*A. spirorbis* ; **b** : des plants d'*E. terreticornis*.

Masse sèche moyenne des parties racinaires par plant, 14 mois après semis en fonction des différents types de sols ; **c** : des plants d'*A. spirorbis* ; **d** : des plants d'*E. terreticornis*.

a



b



**Figure 4 :** Accroissement moyen de la hauteur des plants 14 mois après semis en fonctions des types de sols, **a** : des plants d'*A. spirorbis* ; **b** : des plants d'*E. terreticornis*.

### *Diversité des champignons ectomycorhiziens présents en fonction de l'espèce piège et du substrat*

L'échantillonnage de l'analyse Illumina MiSeq est résumé Table 3. Malgré que près de 46 % des séquences obtenues (515.980) correspondent à des espèces ectomycorhiziennes, elles ne représentent que 22 % des OTUs totales (1.460) soit 325 OTUs. Les *A. spirorbis* échantillonnés sur les sites restaurés présentent entre 16 et 23 % d'OTUs ectomycorhiziennes contre 25 à 40 % pour les *T. guillainii* en milieux naturels. Pour les plants d'*A. spirorbis* développées en pépinière, ce sont sur les sols provenant des topsoils AS1, AS2 et AS3 que les proportions d'OTUs ectomycorhiziennes sont les plus importantes (entre 30 et 38 %), et sur TG2 (29 %), AS1 (26 %) et AS3 (25 %) pour les plants d'*E. terreticornis*. L'échantillonnage d'*E. terreticornis* sur LH et SM est considérée comme nulle étant donné que le développement des plants a été insuffisant pour analyser la diversité.

**Table 3 :** Nombres de séquence, nombres d'OTUs 97 % et affiliations de ces séquences et OTUs à des taxons fongiques ectomycorhiziens ou non. Les séquences ont été obtenues par séquençage Illumina Miseq.

	Sol	OTU 97%	Séquences	ECM lineages		Non-ECM lineages	
				OTUs	Séquences	OTUs	Séquences
<b><i>A. spirorbis</i> présents sur les sites sélectionnés</b>	AS1	183	11.310	42 (23 %)	8.325 (74 %)	141	2.985
	AS2	304	25.423	49 (16 %)	14.750 (58 %)	255	10.673
	AS3	339	16.371	64 (19 %)	7.045 (43 %)	275	9.326
<b><i>T. guillainii</i> présents sur les sites sélectionnés</b>	TG1	309	11.972	94 (30 %)	5.908 (49 %)	215	6.064
	TG2	131	4.933	52 (40 %)	3.621 (73 %)	79	1.312
	TG3	318	18.141	81 (25 %)	6.004 (33 %)	237	12.137
<b><i>A. spirorbis</i> semés sur les sols des sites prélevés</b>	AS1	94	10.149	35 (37 %)	6.559 (65 %)	59	3.590
	AS2	76	9.103	23 (30 %)	6.240 (69 %)	53	2.863
	AS3	110	12.655	42 (38 %)	10.235 (81 %)	68	2.420
	TG1	145	12.144	34 (23 %)	5.599 (46 %)	111	6.545
	TG2	131	16.644	22 (17 %)	4.893 (29 %)	109	11.751
	TG3	150	27.714	41 (27 %)	19.496 (70 %)	109	8.218
	SM	141	26.059	29 (21 %)	10.954 (42 %)	112	15.105
	PF	220	31.312	32 (15 %)	7.119 (23 %)	188	24.193
	LH	150	23.102	32 (21 %)	4.494 (19 %)	118	18.608
<b><i>E. terreticornis</i> semés sur les sols des sites prélevés</b>	AS1	109	28.789	28 (26 %)	18.591 (65 %)	81	10.198
	AS2	164	39.515	33 (20 %)	19.064 (48 %)	131	20.451
	AS3	197	41.647	49 (25 %)	26.305 (63 %)	148	15.342
	TG1	191	48.954	21 (11 %)	603 (1 %)	170	48.351
	TG2	24	315	7 (29 %)	205 (65 %)	17	110
	TG3	133	48.671	26 (20 %)	37.663 (77 %)	107	11.008
	SM	-	-	-	-	-	-
	PF	224	51.057	17 (8 %)	12.375 (24 %)	207	38.682
	LH	-	-	-	-	-	-
<b>Totaux</b>		1460	515.980	325 (22 %)	236.048 (46 %)	1135	279.932

Les indices de diversité (Table 4), indiquent que la totalité de la richesse ectomycorhizienne estimée a été échantillonnée si l'on prend l'ensemble de l'échantillonnage (1.460 OTUs obtenues et estimées). Si l'on prend les différentes espèces plantées séparément, au moins 50 % de la richesse ectomycorhizienne estimée a été échantillonnée pour chaque type de plantes. Les diversités associées aux arbres sur le massif (maquis naturels et plantations) ont des taux de diversité de Shannon supérieur à 3, sachant que l'indice est généralement échelonné entre 0 et 5, cela traduit une diversité relativement élevée. C'est sur les *T. guillainii* que ces indices sont les plus élevés avec un indice de 4,2 pour TG1. Sur les plants d'*A. spirorbis* développés en pépinière sur substrats, ils sont situés entre 1,92 et 2,77, traduisant une diversité plus faible. Les plants développés sur TG2 (2,77) et PF (2,69) permettent d'observer les indices les plus élevés, tandis que pour les plants d'*E. terreticornis*, les indices vont de 1,09 à 2,40, traduisant une diversité encore plus réduite par rapport à *A. spirorbis*, avec des valeurs les plus élevées sur AS3 (2,29) et sur PF (2,23). Enfin, d'après l'indice de Simpson la probabilité d'observer des individus du même taxon sur les communautés associés aux arbres des substrats échantillonnés est très élevée (entre 88 et 97 %), elle est supérieure à 93 % pour les *T. guillainii*. Pour les plants d'*A. spirorbis* développés sur les substrats échantillonnés, la probabilité varie de 74 à 89 %. Enfin pour les plants d'*E. terreticornis*, elle varie de 79 à 85 % sur substrat AS, mais de 41 % (TG3) à 73 % (TG1) sur les substrats TG, et atteint 77 % sur PF. La diversité d'*E. terreticornis* sur LH et SM est considérée comme nulle étant donné que l'insuffisance de développement des plants n'a pas permis d'analyser la diversité.

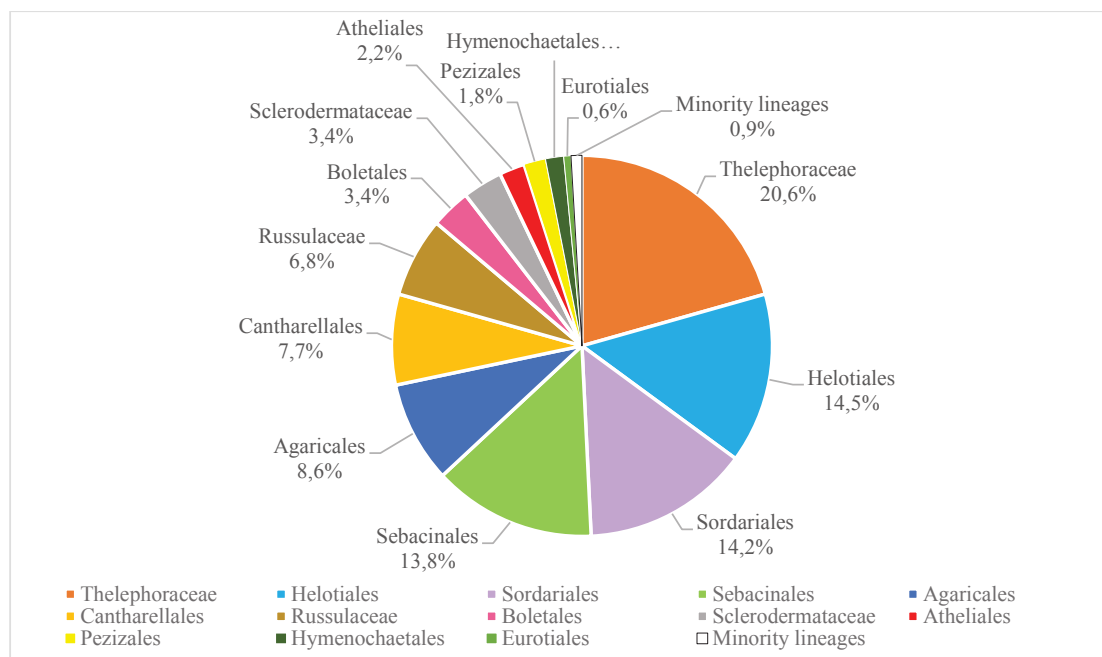
**Table 4 :** Indices de diversité observées et estimées de la distribution des OTUs fungiques totales selon l'espèce hôte, la provenance du sol et les conditions de développement de l'espèce hôte, basés sur le package R « iNext » (Hsieh *et al.* 2016).

		Richness <sup>0</sup> D		Shannon <sup>1</sup> D		Simpson <sup>2</sup> D	
		Observé	Estimé	Observé	Estimé	Observé	Estimé
<i>A. spirorbis</i> présents sur les sites sélectionnés	AS1	183	262,60	3,23	3,24	0,93	0,93
	AS2	304	394,01	3,22	3,23	0,88	0,88
	AS3	339	394,04	3,95	3,96	0,96	0,96
<i>T. guillainii</i> présents sur les sites sélectionnés	TG1	309	379,62	4,20	4,21	0,97	0,97
	TG2	131	149,89	3,25	3,26	0,93	0,93
	TG3	318	353,56	4,13	4,14	0,97	0,97
<i>A. spirorbis</i> semés sur les sols des sites prélevés	AS1	94	184,99	2,16	2,17	0,80	0,80
	AS2	76	148,00	1,92	1,93	0,78	0,78
	AS3	110	165,68	2,09	2,10	0,78	0,78
	TG1	145	189,02	2,19	2,20	0,79	0,79
	TG2	131	173,00	2,77	2,77	0,89	0,89
	TG3	150	206,18	2,04	2,04	0,74	0,74
	SM	141	199,78	2,16	2,17	0,81	0,81
	PF	220	247,56	2,69	2,69	0,88	0,88
	LH	150	199,44	2,46	2,46	0,86	0,86
<i>E. terreticornis</i> semés sur les sols des sites prélevés	AS1	109	151,47	1,95	1,95	0,79	0,79
	AS2	164	204,33	2,40	2,40	0,85	0,85
	AS3	197	239,87	2,29	2,29	0,83	0,83
	TG1	191	213,04	2,14	2,14	0,73	0,73
	TG2	24	27,49	1,65	1,70	0,63	0,63
	TG3	133	153,83	1,09	1,10	0,41	0,41
	PF	224	254,37	2,23	2,23	0,77	0,77
<b>Echantillonnage TOTAL</b>		1460	1460	3.785	3.786	0.93	0.93

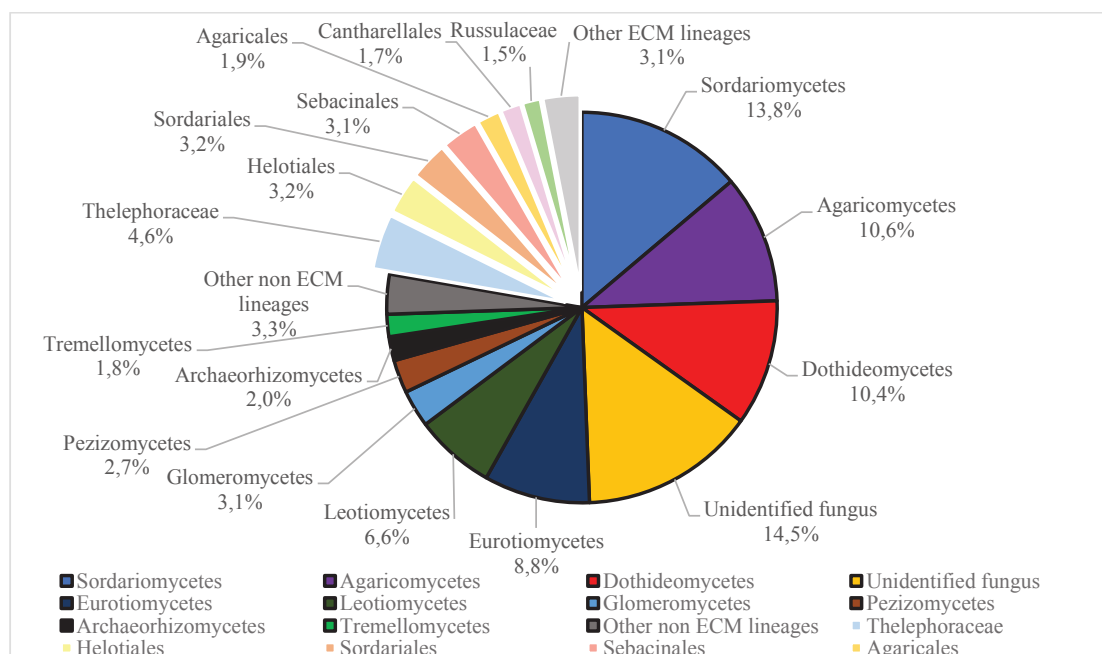
La répartition des principaux lineages ectomycorhzien sur l'échantillonnage total est présentée Figure 5a. Il apparait que les lineages ectomycorhziens les plus représentés sont respectivement les *Thelephoraceae* (20,6 %), les Helotiales (14,5 %), les Sordariales (14,2 %), les Sebacinales (13,8 %), les Agaricales (8,6 %), les Cantharellales (7,7 %), les *Russulaceae* (6,8 %), les Boletales (3,4 %) et les *Sclerodermataceae* (3,4 %). Les répartitions des lineages fongiques totaux sont présentées Figure 5b.



a

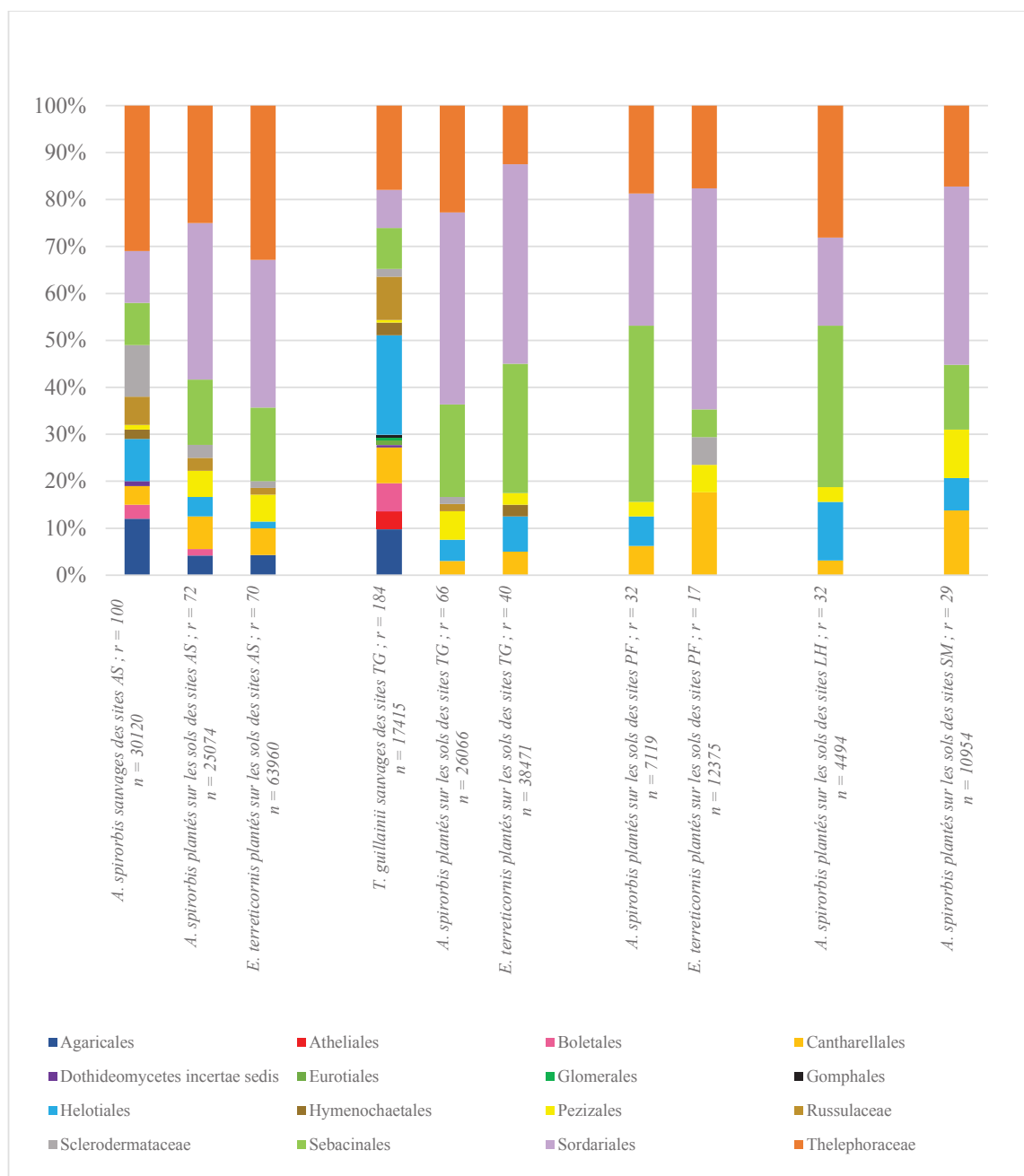


b



**Figure 5:** Distribution des lineages de champignons ectomycorhiziens de l'échantillonnage total : **a** : en fonction du nombre d'OTUs ; Distribution des lineages de champignons de l'échantillonnage total : **b** : en fonction du nombre d'OTUs

Les proportions des principaux lineages ectomycorhiziens en fonction de l'espèce hôte et du substrat sont présentée Figure 6. La plupart des lineages présents sur les *A. spirorbis* provenant des sites échantillonnés (AS1, AS2 et AS3), sont également présents sur les plants d'*A. spirorbis* et d'*E. terreticornis* élevés sur ces sols à l'exception des lineages des *Dothideomycetes incertae sedis* et également des Boletales pour les plants d'*E. terreticornis*. On note tout de même que pour les plants d'*A. spirorbis* et d'*E. terreticornis* semés sur les substrats AS, les lineages des Sordariales, des Pezizales, des Sebacinales et des Cantharellales sont en proportions plus importantes que sur les *A. spirorbis* originaires des substrats prélevés. Tandis que les proportions d'Helotiales, de *Sclerodermataceae*, d'Agaricales, d'Hymenochaetales, de Boletales et de *Thelephoraceae* sont moins importantes pour les plants semés que pour les arbres d'origines. Pour les topsoils provenant des maquis naturels à *T. guillainii* (TG1, TG2 et TG3), beaucoup de lineages ectomycorhiziens présents sur les *T. guillainii* d'origines sont absents sur les plants d'*A. spirorbis* et *E. terreticornis* semés sur ces mêmes substrats, notamment les Ateliales, les Agaricales, les Boletales, les *Dothideomycetes incertae sedis*, les Eurotiales et les Gomphales. Les *Sclerodermataceae* et les *Russulaceae* sont également absents des plants d'*E. terreticornis*, et les Hymenochaetales sont absents des plants d'*A. spirorbis*. On note une proportion de Sordariales et de Sebacinales beaucoup plus importante pour les plants semés sur les topsoils TG que sur les *T. guillainii* originaires de ces sites. On note également des proportions de *Thelephoraceae* et de *Sclerodermataceae* un peu plus importantes pour les plants d'*A. spirorbis*. A l'inverse, les Helotiales, les *Russulaceae*, les Cantharellales ainsi que les *Thelephoraceae* (seulement sur les plants d'*E. terreticornis*) sont en proportions moins importantes que sur les *T. guillainii* d'origines. Pour le topsoil PF, on note presque les mêmes lineages sur les deux espèces de plants semés, à l'exception des Helotiales, présentes uniquement sur les *A. spirorbis* et les *Sclerodermataceae* présents uniquement sur les *E. terreticornis*. Autrement, on note que les plants d'*E. terreticornis* ont une plus grande proportion de Sordariales, de Cantharellales et de Pezizales, tandis que les plants d'*A. spirorbis* ont une proportion de Sebacinales bien plus importante. Les plants d'*A. spirorbis* sur les substrats LH et SM ont exactement les mêmes lineages que ceux du topsoil PF.



**Figure 6:** Distribution des champignons des différentes modalités basées sur l'espèce hôte, la provenance du sol et les conditions de développement de l'espèce hôte selon la distribution des OTUs des lineages de champignons ectomycorhiziens identifiés. Pour chaque modalité, l'indice de Jackknife caractérisant la richesse spécifique observée (nombre d'OTUs) est précédé d'un « r » et le nombre de séquences obtenues est représenté par un « n ».

En termes de diversité de lineages (Figure 6), pour les arbres provenant des topsoils échantillonnés, les *T. guillainii* originaires des topsoils TG (16) ont plus de lineages que les *A. spirorbis* originaires des topsoils AS (12). Mais pour les plants semés sur les mêmes substrats, il y a plus de diversité sur les topsoils AS avec 10 lineages pour les plants d'*A. spirorbis* et 9 pour les *E. terreticornis*, contre, chez les plants développés sur les topsoils TG, 8 lineages pour les plants d'*A. spirorbis* et 7 lineages pour les *E. terreticornis*. La diversité des lineages sur les substrats de verses est moins importante, seulement 6 lineages pour les plants d'*A. spirorbis* et d'*E. terreticornis* sur topsoil PF et 6 lineages également pour les plants d'*A. spirorbis* développés sur les substrats LH et SM. Pour les plants d'*E. terreticornis* sur LH et SM, cette diversité n'est pas prise en compte étant donné l'insuffisance de développement des plants dans ces substrats.

Le  $\chi^2$  d'indépendance entre les communautés ectomycorhiziennes des arbres originaires des sites sélectionnés et ceux des plants semés sur les mêmes sols (Table 5.a) montrent pour les sols AS1 et AS2 des communautés similaires entre les plants d'*A. spirorbis* et d'*E. terreticornis* semés et les *A. spirorbis* d'origines, mais des communautés indépendantes sur le topsoil AS3 (p-values de 0,01468 et 0,01059). Pour les sols TG et les plants semés sur ces mêmes sols, on observe des communautés toutes indépendantes (p-values toutes inférieures à 0,05) sauf pour les *T. guillainii* originaires des TG2 et les plants d'*E. terreticornis* semés ce même sol (p-value de 0,06673) qui ont donc des communautés ectomycorhiziennes corrélées (Table 5.a).

Enfin les calculs de  $\chi^2$  d'indépendance entre les communautés ectomycorhiziennes des plants d'*A. spirorbis* et *E. terreticornis* originaires des substrats sélectionnés (Table 5.b) ont tous des p-values largement supérieures à 0,05 et ont donc des communautés ectomycorhiziennes corrélées.

**Table 5 :** Comparaison deux à deux de la diversité taxonomique des lineages ectomycorhiziens avec le test de Chi<sup>2</sup> d'indépendance de Pearson : **a** : des communautés des 3 topsoils AS (AS1, AS2 et AS3), des 3 topsoils TG (TG1, TG2 et TG3) et des 3 substrats de vers (SM, PF et LH) sur les individus originaires des sites et sur les plants développés sur les sols correspondants après 14 mois de développement ; **b** : des communautés des topsoils AS et TG regroupés et des 3 substrats de vers

**Hypothèse :** Les communautés comparées suivent des distributions corrélées. Au risque 5 % l'Hypothèse est rejetée.

Un test significatif indique que les communautés ont une distribution indépendantes l'une de l'autre : - : non significatif ;

\*\* : significatif ; \*\*\* : très significatif ; \*\*\*\* : extrêmement significatif

**a**

Arbres présents sur les sites sélectionnés	TG				
	AS	0,004903**			
Plants d'A. spirorbis semés sur les sols des sites	AS		TG	SM	PF
	TG	0,6844			
	SM	0,7421	0,5383		
	PF	0,3156	0,5634	0,3237	
	LH	0,1628	0,2875	0,1005	0,8145
Plants d'E. terreticornis semés sur les sols des sites	AS		TG	SM	PF
	TG	0,1031			
	SM	x	x		
	PF	0,453	0,2157	x	
	LH	x	x	x	x

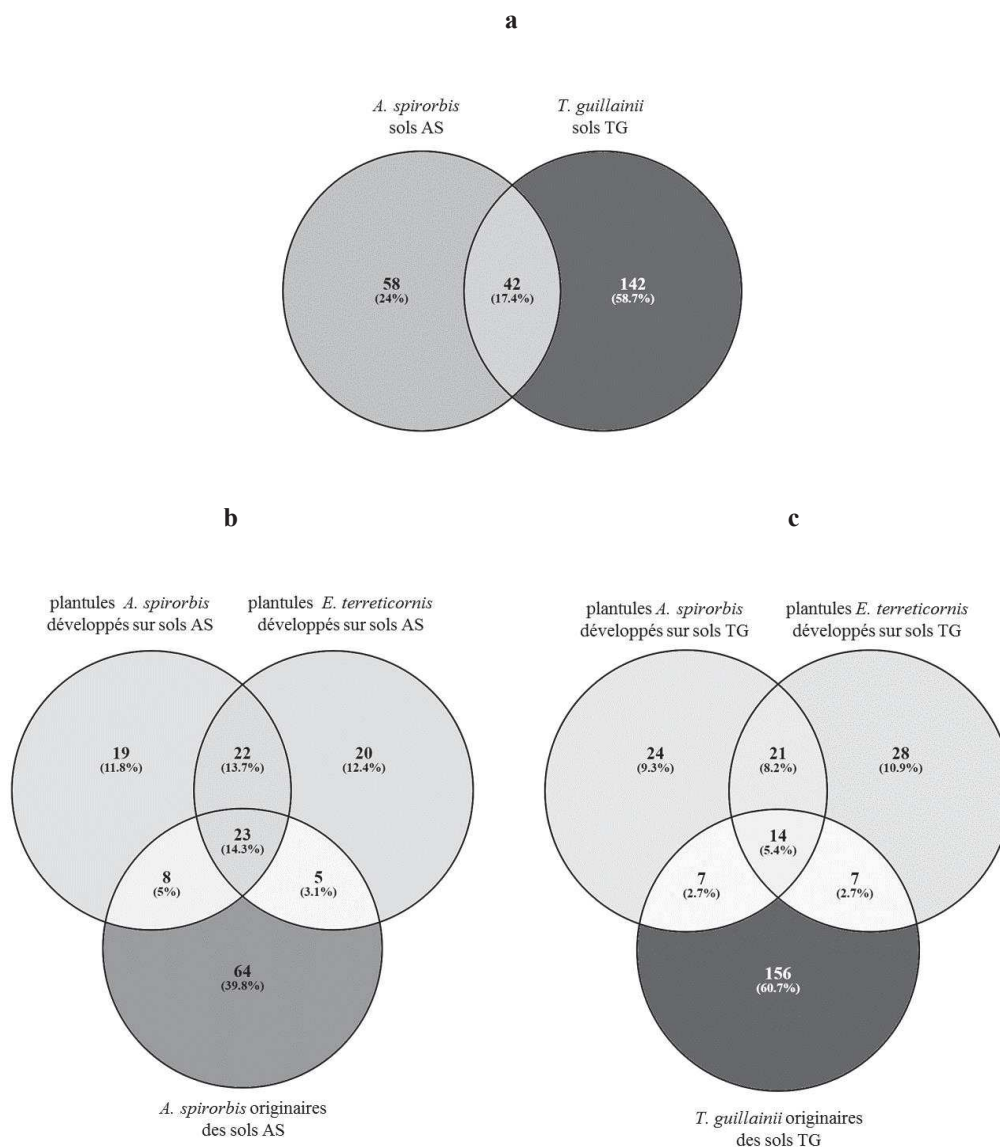
**b**

Arbres présents sur les sites sélectionnés	AS1 AS2		TG1 TG2			
	AS2	0,8595	TG2	0,4022		
	AS3	0,8905 0,9537	TG3	0,4868 0,06022		
Plants d' <i>A. spirorbis</i> semés sur les sols des sites	AS1 AS2		TG1 TG2		SM PF	
	AS2	0,6074	TG2	0,2341	PF	0,3237
	AS3	0,177 0,2099	TG3	0,505 0,02027**	LH	0,1005 0,8145
Plants d' <i>E. terreticornis</i> semés sur les sols des sites	AS1 AS2		TG1 TG2		SM PF	
	AS2	0,7506	TG2	0,4385	PF	x
	AS3	0,4669 0,2599	TG3	0,0289 5** 0,3144	LH	x x

Les représentations graphiques sous forme de diagramme de Venn mettent en évidence 17,4 % d'OTUs communes entre les communautés fongiques totales d'*A. spirorbis* et de *T. guillainii* sur les arbres originaires des sites sélectionnés (Figure 7.a).

Concernant les topsoils AS (Figure 7.b), on note que la majorité des OTUs identifiées provient des *A. spirorbis* d'origines (39,8%). Mais on observe tout de même 22,4% d'OTUs (14,3% + 5% + 3,1%) sont partagées avec les plants semées sur ces mêmes substrats, dont 5 % uniquement avec les *A. spirorbis* et 3,1% uniquement avec les *E. terreticornis* (Figure 7.b).

Concernant les topsoils TG (Figure 7.c), la grande majorité des OTUs provient des *T. guillainii* d'origine (60,7 %). Mais on observe tout de même 10,8 % de ces OTUSs (5,4% + 2,7% + 2,7%) sont partagées avec les plants semés sur ces mêmes sols, dont 2,7 % uniquement avec les plants semés d'*A. spirorbis* et autant avec les *E. terreticornis* (Figure 7.c).



**Figure 7:** Diagrammes de Venn des distributions des OTUs fongiques totales : **a** : entre les *A. spirorbis* provenant des topsoils AS regroupés (AS1, AS2 et AS3) ; **b** : entre les *A. spirorbis* provenant des topsoils AS regroupés et les plants d'*A. spirorbis* et d'*E. terreticornis* développés sur les topsoils AS regroupés ; **c** : entre les *T. guillainii* provenant des topsoils TG regroupés et les plants d'*A. spirorbis* et d'*E. terreticornis* développés sur les topsoils TG regroupés.

### *Corrélations entre paramètres géochimiques et composition des communautés ectomycorhiziennes*

Le test de Mantel (Table 6) indique une corrélation significative entre les composants des sols et la diversité ectomycorhizienne des OTUs, la corrélation est particulièrement significative pour la diversité ectomycorhiziennes des plants d'*E. terreticornis* (0,7194).

**Table 6 :** Test de Mantel (100 k permutations) basé sur la corrélation de Pearson entre les variables : composants géochimiques des sols et diversité ectomycorhizienne des OTUs. Hypothèse : Les variables ne sont pas liées entre elles. L'hypothèse est rejetée au risque de 5 %. Un test significatif indique que les variables sont liées entre elles :

- : non significatif ; \* : peu significatif ; \*\* : significatif ; \*\*\* : très significatif ; \*\*\*\* : extrêmement significatif

	<b>Arbres présents sur les sites sélectionnés</b>	<b><i>A. spirorbis</i> semés sur les sols des sites prélevés</b>	<b><i>E. terreticornis</i> semés sur les sols des sites prélevés</b>
<b>r</b>	0,5403	0,4211	0,7194
<b>p-value</b>	0,043056	0,01251	0,0065476
<b>Significance</b>	**	**	***

Concernant l'influence des facteurs géochimiques des sols sur cette diversité, la Permanova (ESM Table 3) indique pour les arbres présents sur les sols échantillonnés des corrélations significatives du phosphore et du fer et dans une moindre mesure avec le chrome, le cobalt et l'aluminium. Pour les plants d'*A. spirorbis* semés sur ces sols, les corrélations sont significatives avec la pF3, le phosphore, le fer et le chrome. Pour les plants d'*E. terreticornis*, la corrélation est très significative avec le fer, significative avec le phosphore, le nickel et le magnésium.

Sur les NMDS à deux dimensions de la diversité ectomycorhizienne selon le type de sols et les composants géochimiques qui les caractérisent, on observe pour les arbres présents sur les sites échantillonnés, des groupements bien distincts entre les topsoils AS1, AS2, AS3, TG1, TG2 et TG3 (Figure 8.a). Les lineages ectomycorhiziens des 3 topsoils AS1, AS2 et AS3 sont plutôt regroupés notamment pour AS1 et AS2, et ce sont les *Sclerodermataceae*, les *Thelephoraceae*, les Sordariales, les Pezizales et les Agaricales qui sont le plus

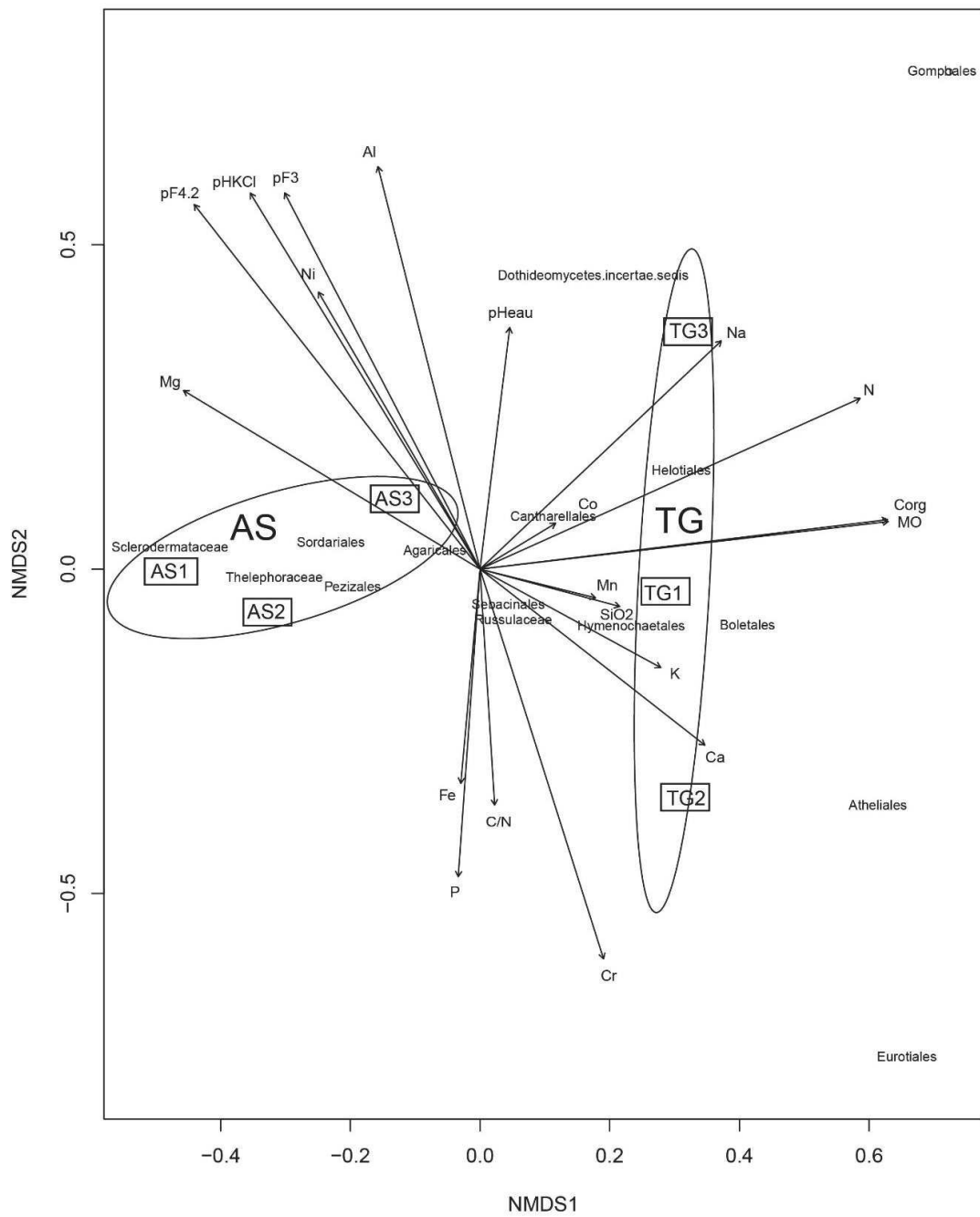


représentatives mais ne semblent pas particulièrement corrélés avec un paramètre géochimique en particulier (Figure 8.a). Tandis que pour les communautés ectomycorhiziennes des topsoils TG1, TG2 et TG3, elles sont nettement plus dispersées, aucun lineage ectomycorhizien ne semble particulièrement représentatif sur TG2, les Boletales et les Hymenochaetales sont les lineages les plus représentatifs du topsoil sur TG1 et semblent liés par la présence de silice, de Mn et de K. Enfin le lineage *Dothideomycetes incertae sedis* semblent être les plus représentative sur TG3 et lié à la présence de Na et au pH (Figure 8a). Les Cantharellales semblent également lié à la présence de Co.

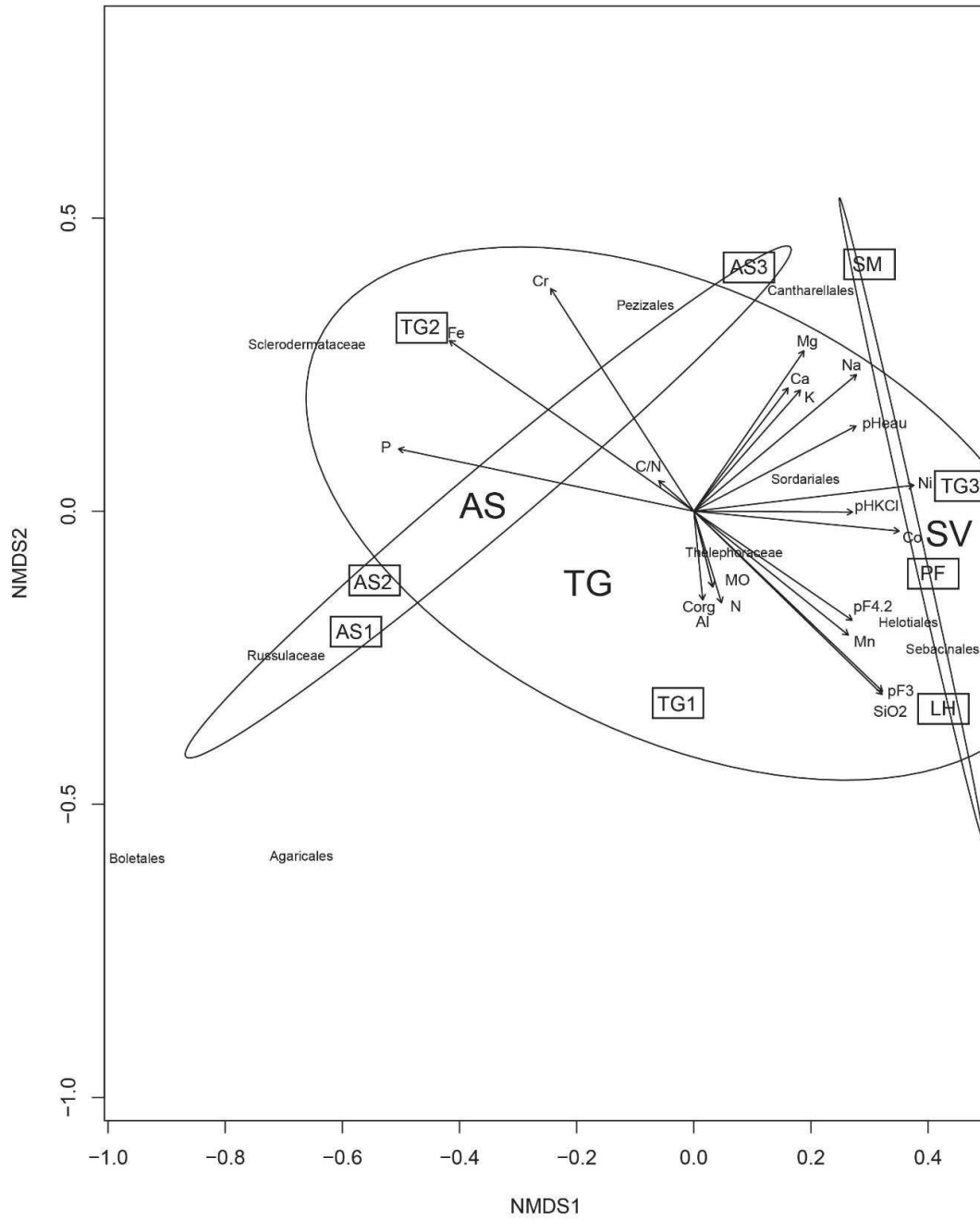
*Ex situ*, pour les plants d'*A. spirorbis* semés, les communautés ectomycorhiziennes sur les topsoils AS1, AS2 et AS3 sont beaucoup plus dispersés, notamment pour AS3, les *Russulaceae* sont les plus représentatives sur les topsoils AS1 et AS2 alors que ce sont les Cantharellales sur les substrats AS3 et SM (Figure 8.b). Les communautés ectomycorhiziennes des topsoils TG1, TG2 et TG3 sont très dispersées, les *Sclerodermataceae* sont liés à la présence de Fe et de P et représentatives du topsoil TG2. Aucuns lineages ne semble représentatif des topsoils TG1 et TG3, alors que les Helotiales et les Sebacinales sont représentatifs des topsoils PF et LH qui paraissent liés à la présence de Co sur topsoil PF, et à la silice et à la pF3 sur topsoil LH (Figure 8.b). Les *Thelephoraceae* apparaissent comme liés à la matière organique et l'Al (Figure 8.b).

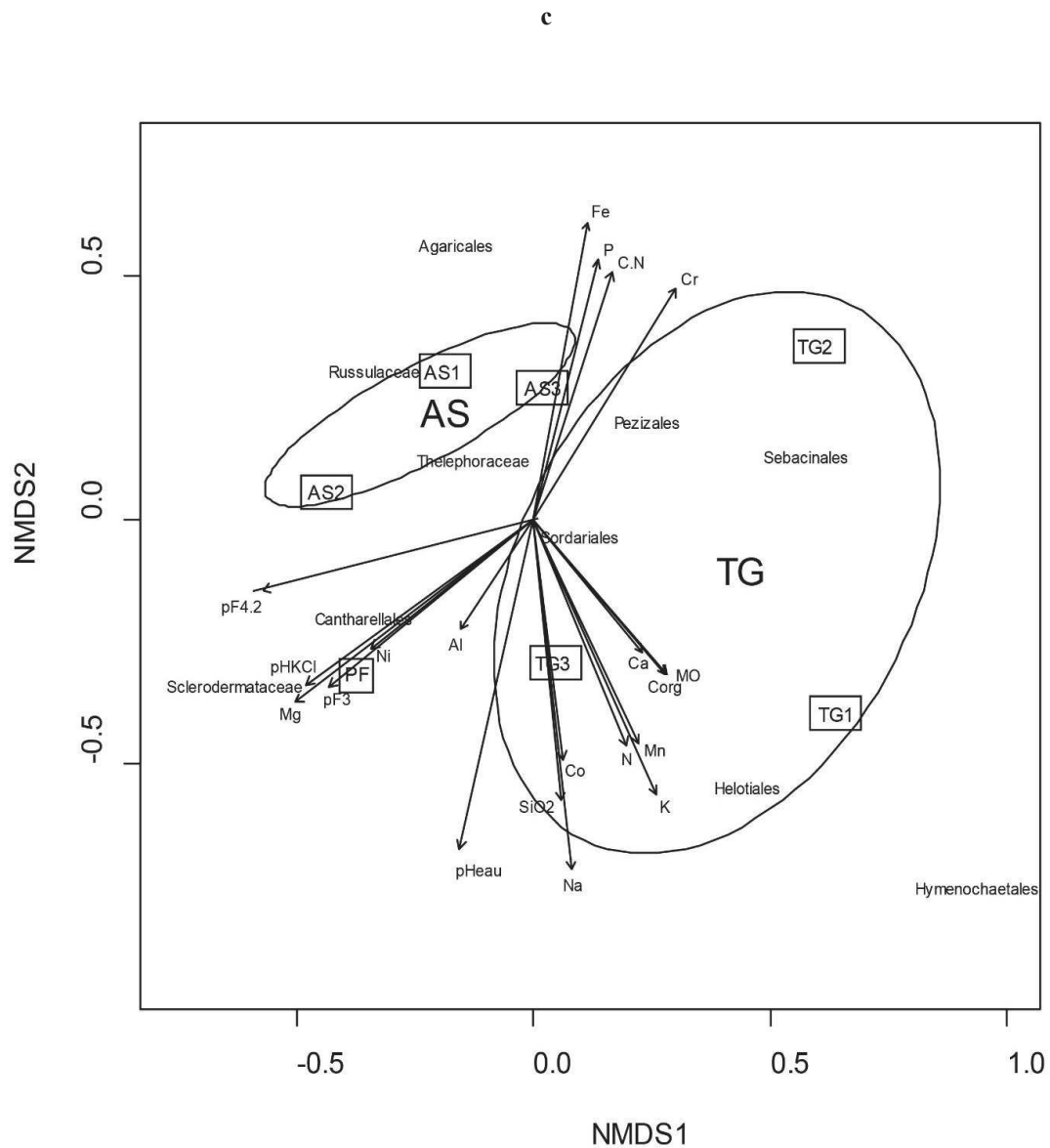
Enfin, pour les plants d'*E. terreticornis* semés, sur les topsoils AS1, AS2 et AS3 les communautés ectomycorhiziennes sont assez regroupées et représentées par les *Russulaceae* et les *Thelephoraceae*, mais ne paraissent pas lié à la présence d'un élément en particulier (Figure 8.c). Concernant les communautés ectomycorhiziennes des topsoils TG1, TG2 et TG3, elles sont encore une fois très dispersées, sur TG2 on note tout de même une légère corrélation avec les Sebacinales et les Pezizales, ces dernières paraissent légèrement liées à la présence de Cr. Sur TG1, même constat, les communautés de ce topsoil ne sont pas clairement représentées par un lineages sinon par les Helotiales qui semblent lié à la présence de K, de Mn et d'N (Figure 8.c). Pour TG3, aucun lineage n'est vraiment représentatif. Enfin sur le topsoil PF, ce sont les communautés de *Sclerodermataceae* et de Cantharellales qui prédominent. Les *Sclerodermataceae* semblent liés à la pF3 et au pH(KCl) ainsi qu'à la présence de Mg. Pour les Cantharellales, ils semblent corrélés à la présence de Ni (Figure 8.c).

**a**



b





**Figure 8 :** NMDS (Non-metric Multidimensional Scaling) à deux dimensions de la diversité des lineages ectomycorhiziens en fonction des sols et de leurs composants géochimiques ; **a :** Pour les arbres présents sur les sites sélectionnés ; **b :** Pour les *A. spirorbis* semés sur les sols des sites prélevés ; **c :** Pour les *E. terreticornis* semés sur les sols des sites prélevés.

## Discussion

Il apparaît de l'analyse des composés géochimiques que les topsoils du maquis à *T. guillainii* sont plus riches en nutriments et en matières organiques que les sols restaurés avec *A. spirorbis* et les substrats de verses, notamment SM. Cette différence s'explique par le fait qu'en maquis, de la matière organique est continuellement apportée par les espèces présentes. Pour les sols sous *A. spirorbis*, il s'agit de sols excavés, composés de stérile miniers, et qui ont été restaurés avec une seule espèce, *A. spirorbis*, il y a une douzaine d'année. Ainsi, l'apport de matières organiques sur une période aussi brève ne suffit pas pour reconstituer un sol comparable à un sol qui n'a jamais été altéré comme ceux des maquis à *T. guillainii*, mais on constate une très nette, si l'on compare avec le substrat SM. Pour les substrats de verses, notamment pour ceux issus des verses de topsoil para forestier ou de maquis ligno-herbacée, la matière organique est encore bien présente mais elle a commencé à se dégrader en raison de son stockage (Bordez, 2015). Pour le substrat de verse SM, il provient de sols excavés sous les couches de top soil, que l'on appelle stérile minier et qui sont donc très pauvre en matières organiques restées en surface, dans le top soil. Les topsoils provenant de TG ont des compositions très diversifiées comparé à ceux de AS, Cette disparité s'explique par le fait que les 3 sols TG proviennent de sites différents, ces sites n'ayant jamais été directement impacté par la mine ont chacun développés des micro-écosystèmes composés d'une multitude d'espèces et ayant pu évoluer différemment. Les sols AS sont des sites restaurés, donc ils sont à un stade très « jeune », d'une part les sols utilisés lors de la restauration des sites provenaient de verse de stérile minier datant plus ou moins de la même période à quelques années près, d'autre part l'écosystème reste pour l'instant composé d'*A. spirorbis* et de très rares espèces ont pu s'installer sous le couvert de ces plantations monospécifiques.

Les composants géochimiques du sol n'influent pas sur la répartition de la biomasse au sein de la plante mais ils influent sur le développement des plants selon les proportions de certains composants géochimiques. Les plants présentent de meilleurs développements sur un sol riche en matières organiques et en éléments nutritifs comme les topsoils TG, AS, PF et LH comparé au stérile minier (SM). La hauteur et la biomasse évoluent de la même façon en fonction du type de sol ce qui indique que ces deux paramètres sont des indicateurs potentiels pour l'étude du développement en fonction du type de sol (Weil et Brady, 2016)

Pour les deux espèces pièges, *A. spirorbis* et *E. terreticornis*, les plants développés sur les sols provenant des zones revégétalisées avec des plantations d'*A. spirorbis* (AS1, AS2 et AS3) sont ceux ayant le meilleur développement, notamment le top soil AS2. La présence d'*A. spirorbis* aurait donc un effet significativement positif sur le développement des plants, qui serait dû à la présence de cette espèce en particulier puisque les plants développées sur les topsoils prélevés sous *T. guillainii* en maquis naturel (TG1, TG2 et TG3) ont des développements nettement moins importants. Ce constat rejoint le résultats d'autres études sur la capacité des Acacias en restauration écologiques (Duponnois et al., 2001; Padilla et Pugnaire, 2006; Ren et al., 2008; Yang et al., 2009). On constate également que sur les substrats de verse les plants sont les moins développés, notamment sur SM et LH. Le fait que *E. terreticornis* n'ai pas poussé sur les substrats de verse SM et LH va dans l'hypothèse que la présence d'une espèce nurse est un élément important pour une plantation réussie sur un sol pauvre en élément nutritif avec un potentiel de toxicité polymétallique.

Près de la moitié des séquences obtenues ont été attribuée à des taxons ectomycorhiziens, mais en termes de diversité taxonomique, la diversité est deux fois moins importante. Ainsi, dans notre cas, les champignons ectomycorhiziens sont moins diversifiés que les champignons non ectomycorhiziens.

Bien que sur les sites de prélèvement des topsoils, la diversité ectomycorhizienne soit près de deux fois plus importante pour les *T. guillainii* des topsoils TG que pour les *A. spirorbis* des plantations. En pépinière les plants développent plus de diversité taxonomique ectomycorhizienne sur les topsoils AS que sur les topsoils TG et les substrats de verses. Ainsi la diversité ectomycorhizienne qui s'associe aux racines d'une espèce piège serait liée et encouragé par « l'empreinte » de la plante nurse qui s'est développée sur le sol utilisé comme substrat de plantation. De plus, l'intensité de cet effet sur l'espèce piège dépendrait de l'espèce de la plante nurse, c'est le cas d'*A. spirorbis* qui a un effet supérieur à *T. guillainii* sur les plants pièges bien que sa diversité taxonomique d'origine soit moins importante. Le choix de l'espèce cible importe également, puisqu'on observe une meilleure diversité sur les *A. spirorbis* que sur les *T. guillainii*, bien que sur ces derniers la diversité soit tout à fait correcte. Un constat qui apparait pour d'autres espèces nurses comme *Asteropeia mcphersonii* (Henry et al., 2015 ; Jourand et al., 2014 ; Padilla and Pugnaire, 2006) ou d'autres espèces d'acacias australiens (Henry et al., 2015 ; Jourand et al., 2014 ; Padilla and Pugnaire, 2006).

Concernant les taxons identifiés, les *Thelephoraceae*, les Helotiales et les Sebacinales sont les plus représentés, des résultats assez similaires à ceux de l'étude de la diversité ectomycorhizienne associée à *A. spirorbis* en Nouvelle-Calédonie, la publication du Chapitre 1 prochainement publié dans la revue Microbial Ecology. Ainsi la diversité recensée dans cet essai *ex situ* est donc représentative de celle recensée sur les *A. spirorbis in situ* en Nouvelle-Calédonie.

Les lineages ectomycorhiziens provenant des *A. spirorbis in situ* originaires des sites AS sont pour la plupart également présents sur les plants d'*A. spirorbis* et d'*E. terreticornis* semés sur ces mêmes topsoils (AS) *ex situ*. On constate la même chose au niveau taxonomique, les comparaisons des taxons identifiés à 97 % d'homologie indiquent des communautés liées entre elles pour les ectomycorhizes provenant des *A. spirorbis in situ* des sites AS1 et AS2 et les communautés des plants plantées *ex situ* sur ces topsoils. Ainsi, on peut émettre l'hypothèse qu'*A. spirorbis* a une capacité à transférer ses communautés par le topsoil, capacité qui se maintiendra pendant un temps à déterminer, même si l'arbre hôte n'est plus présent.

A contrario, sur les topsoils TG, on observe que beaucoup de lineages sont absents entre les prélèvements des *T. guillainii in situ* des sites TG et sur les plants développés *ex situ* sur ces topsoils. Au niveau taxonomique, les communautés sont toutes indépendantes pour les ectomycorhizes provenant des *T. guillainii* des sites TG et celles des plants plantées sur les topsoils correspondants. On ne retrouve donc pas avec *T. guillainii* la capacité d'*A. spirorbis* à maintenir et à transférer par le topsoil ses communautés ectomycorhiziennes.

Au niveau taxonomique, le nombre de taxons ectomycorhiziens communs entre les échantillons provenant des arbres *in situ* des topsoils échantillonnés et ceux des plantes pièges *ex situ* développées sur ces topsoils est plus de deux fois plus important pour les topsoils provenant des sites à *A. spirorbis* (AS) que des sites à *T. guillainii* (TG) ce qui conforte l'hypothèse que le transfert ectomycorhiziens avec *A. spirorbis* est supérieur à celui de *T. guillainii*.

Les espèces de plantes pièges choisis dans cette étude n'ont pas d'influence puisque les distributions des communautés ectomycorhiziennes des plants d'*E. terreticornis* et d'*A. spirorbis* sont corrélées sur tous les types de sol. La question de réaliser des semis avec *T. guillainii* a été posée et même mis en œuvre ; comme

c'est le cas pour beaucoup d'espèces endémiques, la maîtrise de la qualité des graines est encore insuffisante et nous n'avons pas réussi à obtenir assez de plants pour traiter les résultats.

Les analyses statistiques nous indiquent une corrélation entre la distribution des ectomycorhizes associées aux plants *ex situ* et les paramètres géochimiques des sols sur lesquels elles se sont développés, notamment pour *E. terreticornis*. Cette corrélation est surtout valable pour le phosphore et le fer, ce qui pourrait être expliqué par les connexions de ces éléments avec les ectomycorhizes. En effet, le phosphore est un élément qui est particulièrement mieux assimilé par la plante lorsque celle-ci est ectomycorhizée (Finlay et Read, 1986), et les champignons ectomycorhiziens sont reconnus pour leur capacité de produire des sidérophores chélateurs de fer (Szaniszlo et al., 1981). Il apparaît également que la présence de silice, de Mn et de K influencerait la présence des Boletales, des Helotiales et des Hymenochaetales. Les Cantharellales seraient influencés par la présence de Co et de Ni. Et les *Thelephoraceae* seraient influencés par la présence de matières organiques et d'Al. Des études ont démontrés que certains métaux pouvaient être absorbés par certaines espèces de champignons ectomycorhiziens, en fonction du pH du sol et de la présence de matières organiques, c'est le cas du nickel et du cobalt, (Severoglu et al., 2013). Cela pourrait être une hypothèse justifiant cette structuration des espèces ectomycorhiziennes en fonction de certains éléments géochimiques.

## Remerciements

Ce travail a été mené dans le cadre d'un doctorat soutenu par KNS dans le cadre d'un contrat CIFRE (CIFRE 2013/1434). Les auteurs souhaitent remercier les projets ANR-12-ADAP-0017 ADASPIR et GIP Nickel et son environnement GIPCNRT98 BIOINDIC pour le financement de ces travaux.



## Références bibliographiques

- Abarenkov, K., Tedersoo, L., Nilsson, R.H., Vellak, K., Saar, I., and Veldre, V. (2010). Evolutionary Bioinformatics PlutoF — a Web Based Workbench for Ecological and Taxonomic Research , with an Online Implementation for Fungal ITS Sequences. *Evol. Bioinforma.* 6, 189–196.
- Bordez, L. (2015). Stratégies de re-végétalisation des maquis miniers nickélifères de Nouvelle-Calédonie : étude sur les potentiels biologiques des topsoils et leur gestion en vue de leur utilisation pour la restauration écologique du milieu dégradé. Université de la Nouvelle-Calédonie- École doctorale du Pacifique ED469.
- Bordez, L., Jourand, P., Ducouso, M., Carriconde, F., Cavaloc, Y., Santini, S., Claverie, J.M., Wantiez, L., Leveau, A., and Amir, H. (2016). Distribution patterns of microbial communities in ultramafic landscape: A metagenetic approach highlights the strong relationships between diversity and environmental traits. *Mol. Ecol.* 2258–2272.
- Chao, A., Chazdon, R.L., Colwell, R.K., and Shen, T.-J. (2005). A new statistical approach for assessing similarity of species composition with incidence and abundance data. *Ecol. Lett.* 8, 148–159.
- Duponnois, R., Plenchette, C., and Bâ, A.M. (2001). Growth stimulation of seventeen fallow leguminous plants inoculated with *Glomus aggregatum* in Senegal. *Eur. J. Soil Biol.* 37, 181–186.
- Finlay, R., and Read, D.J. (1986). J. READ Botany Department, University of Sheffield, Sheffield, S10 2TN {Accepted 23 December 1985}. *New Phytol.* 103, 157–165.
- Henry, C., Raivoarisoa, J.F., Razafimamonjy, A., Ramanankierana, H., Andrianaivomahefa, P., Selosse, M.A., and Ducouso, M. (2015). *Asteropeia mepherosonii*, a potential mycorrhizal facilitator for ecological restoration in Madagascar wet tropical rainforests. *For. Ecol. Manage.* 358, 202–211.
- Hsieh, T.C., Ma, K.H., and Chao, A. (2016). iNEXT: An R package for rarefaction and extrapolation of species diversity (Hill numbers). *Methods Ecol. Evol.*
- Ihrmark, K., Bodeker, I.T.M., Cruz-Martinez, K., Friberg, H., Kubartova, A., Schenck, J., Strid, Y., Stenlid, J., Brandström-Durling, M., Clemmensen, K.E., et al. (2012). New primers to amplify the fungal ITS2 region - evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* 82, 666–677.

- Jourand, P., Ducousso, M., Reid, R., Majorel, C., Richert, C., Riss, J., and Lebrun, M. (2010). Nickel-tolerant ectomycorrhizal *Pisolithus albus* ultramafic ecotype isolated from nickel mines in New Caledonia strongly enhance growth of the host plant *Eucalyptus globulus* at toxic nickel concentrations. *Tree Physiol.* *30*, 1311–1319.
- Jourand, P., Hannibal, L., Majorel, C., Mengant, S., Ducousso, M., and Lebrun, M. (2014). Ectomycorrhizal *Pisolithus albus* inoculation of *Acacia spirorbis* and *Eucalyptus globulus* grown in ultramafic topsoil enhances plant growth and mineral nutrition while limits metal uptake. *J. Plant Physiol.* *171*, 164–172.
- L’Huillier, L., Wulff, A., Gâteblé, G., Fogliani, B., Zongo, C., and Jaffré, T. (2010). La restauration des sites miniers. In *Mines et Environnement de Nouvelle-Calédonie*, pp. 147–230.
- Martin, M. (2010). Cutadapt Removes Adapter Sequences From High-Throughput Sequencing Reads. *EMBnet.journal* *17*, 10–12.
- Padilla, F.M., and Pugnaire, F.I. (2006). The role of nurse plants in the restoration of degraded environments. *Front. Ecol. Environ.* *4*, 196–202.
- Pelletier, B., and Esterle, M. (1995). Revegetation of nickel mines in New Caledonia. In *Quelle Recherche Française En Environnement Dans Le Pacifique Sud ? Bilan et Perspectives*, p. 9.
- Perrier, N., Ambrosi, J.P., Colin, F., and Gilkes, R.J. (2006). Biogeochemistry of a regolith: The New Caledonian koniambo ultramafic massif. *J. Geochemical Explor.* *88*, 54–58.
- Ren, H., Yang, L., and Liu, N. (2008). Nurse plant theory and its application in ecological restoration in lower subtropics of China. *Prog. Nat. Sci.* *18*, 137–142.
- Severoglu, Z., Sumer, S., Yalcin, B., Leblebici, Z., and Aksoy, A. (2013). Trace metal levels in edible wild fungi. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* *10*, 295–304.
- Szaniszlo, A.P.J., Powell, P.E., Reid, C.P.P., Cline, G.R., Url, S., Szaniszlo, P.J., Powell, P.E., Reid, C.P.P., and Cline, G.R. (1981). Production of Hydroxamate Siderophore Iron Chelators by Ectomycorrhizal Fungi. *Mycologia* *73*, 1158–1174.
- Tedersoo, L., May, T.W., and Smith, M.E. (2010). Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: Global diversity,

distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza* 20, 217–263.

Weil, R.R., and Brady, N.C. (2016). The nature and properties of soils.

Yang, L., Liu, N., Ren, H., and Wang, J. (2009). Facilitation by two exotic *Acacia*: *Acacia auriculiformis* and *Acacia mangium* as nurse plants in South China. *For. Ecol. Manage.* 257, 1786–1793.

### **Logiciels utilisés :**

**Cutadaptat** : <https://github.com/marcelm/cutadapt.git>

**Fred's metabarcoding pipeline** : <https://github.com/fredericmahe/swarm.wiki.git>. Mahé, F. (2016)

**PEAR Paired-End reAd mergeR** : <http://www.exelixis-lab.org/pear>

**R software** : <https://www.r-project.org/>

**Swarm** : <https://github.com/torognes/swarm.git>

**Vsearch** : <https://github.com/torognes/vsearch.git>

**Venny 2.1** : Oliveros, J.C. (2007-2015) Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams. <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>

|

**ESM Table 1** : Principales caractéristiques chimiques des sols. Les valeurs en gras sont les plus élevées, les valeurs soulignées les plus faibles.

		AS1	AS2	AS3	TG1	TG2	TG3	SM	PF	LH
Carbone total	%	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Matière organique										
Matière organique	%	1,303	1,933	1,207	2,277	2,910	3,373	0,903	1,890	1,967
Carbone organique	%	0,757	1,123	0,700	1,320	1,687	1,960	0,523	1,093	1,143
Azote total	‰	0,307	0,540	0,337	0,643	0,630	0,887	0,220	0,523	0,403
C/N		25,5	21,2	21,1	20,1	27,9	22,7	24,2	20,9	28,0
Disponibilité de l'eau										
pF3	%	22,5	20,6	25,6	20,6	8,1	19,9	22,4	28,4	29,0
pF4,2	%	17,7	15,9	19,4	12,1	6,2	13,9	17,2	20,8	20,3
Calcimétrie-pH										
pH (KCl)		6,0	6,0	5,9	5,8	4,7	5,8	6,9	6,1	6,0
pH (H <sub>2</sub> O)		5,6	5,7	5,4	5,9	5,4	5,8	7,0	5,9	6,0
Complexe absorbant										
Ca	me/100g	0,483	0,437	0,197	0,247	0,857	1,367	0,443	0,660	0,367
Mg	me/100g	0,447	0,597	0,173	0,590	0,267	0,363	3,507	0,610	1,440
K	me/100g	0,060	0,033	0,023	0,050	0,050	0,053	0,030	0,060	0,057
Na	me/100g	0,090	0,087	0,043	0,037	0,057	0,050	0,037	0,050	0,053
Al	me/100g	0,010	0,010	0,053	0,010	0,015	0,005	0,005	0,005	0,005
Mn	me/100g	0,013	0,060	0,040	0,080	0,113	0,120	0,005	0,047	0,033
H	me/100g	0,005	0,010	0,010	0,010	0,005	0,010	0,005	0,005	0,005
S (Ca, Mg, K, Na)	me/100g	1,090	1,227	0,540	1,017	1,387	1,953	4,017	1,420	1,947
CEC	me/100g	0,97	1,42	0,65	2,11	2,46	3,23	4,67	1,86	2,08
TS	%	138	105	92	69	55	56	90	86	94
pHCo		5,8	5,8	5,4	5,5	5,0	5,7	6,8	6,0	5,8
Eléments totaux										
P	mg/kg	616	594	486	469	721	540	423	426	467
Fe	mg/kg	575000	550000	545000	486333	625000	550000	479000	485000	471167
Ni	mg/kg	4603	5213	7962	5382	943	3911	9336	7338	7962
Mn	mg/kg	2355	2922	4363	8696	1975	2245	6939	4483	6948
Cr	mg/kg	20925	25165	23926	19446	52638	21107	23704	18533	20417
Co	mg/kg	229	363	601	1107	97	246	1283	849	800
Al	mg/kg	28673	30067	33458	31075	15363	31643	22853	23137	23045
Ca	mg/kg	232	176	119	244	276	249	483	249	271
Mg	mg/kg	2518	3729	2593	2630	828	1908	25408	4158	8758
Ca/Mg		0,092	0,047	0,046	0,093	0,333	0,130	0,019	0,060	0,031
K	mg/kg	152	156	147	192	154	155	265	165	174
Na	mg/kg	200	212	204	228	203	222	305	219	236
SiO <sub>2</sub>	mg/kg	1,177	1,907	1,230	10,090	0,363	1,390	8,473	8,840	9,147
Eléments assimilables (DTPA)										
Fe	mg/kg	2,077	4,147	1,817	6,200	19,280	12,720	3,500	6,060	3,213
Cu	mg/kg	0,027	0,093	0,027	0,097	0,143	0,090	0,030	0,067	0,037
Zn	mg/kg	0,067	0,160	0,047	0,147	0,427	0,153	0,087	0,117	0,100
Mg	mg/kg	1,557	9,513	2,893	25,220	14,160	21,867	2,760	13,660	8,460

**ESM Table 2 :** Liste des amorces d'indexages pour le séquençage Illumina MiSeq : InPE.WoLB

**PCR Primer, Index 1**

5' CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATNNNNNNGTGACTGGAGTTC

**PCR Primer, Index 2**

5' CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATACATCGGTGACTGGAGTTC

**PCR Primer, Index 3**

5' CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGCCTAAGTGACTGGAGTTC

**PCR Primer, Index 4**

5' CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTGGTCAGTGACTGGAGTTC

**PCR Primer, Index 5**

5' CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCACTGTGTGACTGGAGTTC

**PCR Primer, Index 6**

5' CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATATTGGCGTGACTGGAGTTC

**PCR Primer, Index 7**

5' CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGATCTGGTGACTGGAGTTC

**PCR Primer, Index 8**

5' CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTCAAGTGTGACTGGAGTTC

**PCR Primer, Index 9**

5' CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCTGATCGTGACTGGAGTTC

**PCR Primer, Index 10**

5' CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATAAGCTAGTGACTGGAGTTC

**PCR Primer, Index 11**

5' CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGTAGCCGTGACTGGAGTTC

**PCR Primer, Index 12**

5' CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTACAAGGTGACTGGAGTTC

**ESM Table 3 :** Analyse de la variance par permutation (Permanova ; 719 permutations) entre la matrice de Bray-Curtis de la diversité ectomycorhizienne des OTUs et les matrices euclidiennes des paramètres géochimiques des modalités étudiées. Hypothèse : Les matrices ne sont pas corrélées. L'Ho est rejetée au risque de 5 %. Un test significatif indique donc que les matrices sont corrélées :

- non significatif ; \* : peu significatif ; \*\* : significatif ; \*\*\* : très significatif ; \*\*\*\* : extrêmement significatif

Matrice euclidienne des paramètres géochimiques des sols	Matrice de Bray Curtis matrix de la diversité ectomycorhizienne		
	Arbres présents sur les sites sélectionnés	<i>A. spirorbis</i> semés sur les sols des sites prélevés	<i>E. terreticornis</i> semés sur les sols des sites prélevés
C/T	-		
MO	0,7292	0,6363	0,3458
Corg	0,7333	0,6371	0,3474
N	0,9653	0,3915	0,7016
pF3	0,1319	0,04985 *	0,03254 *
pF4,2	0,3	0,3226	0,04683 *
pHKCl	0,1639	0,7864	0,02996 *
pHeau	0,06944	0,8433	0,1313
P	0,001389 **	0,02111 *	0,009722 **
Fe	0,002778 **	0,03545 *	0,0003968 ***
Ni	0,075	0,2637	0,004563 **
Mn	0,1139	0,3193	0,153
Cr	0,03611 *	0,02067 *	0,09742
Co	0,04444 *	0,2685	0,06845
Al	0,04583 *	0,1819	0,06111
Ca	0,4861	0,8323	0,2163
Mg	0,1431	0,8803	0,008333 **
K	0,2556	0,8349	0,3929
Na	0,1125	0,7728	0,2673
SiO2	0,1792	0,07645	0,18

## Chapitre 3

Potentiel de la plante nurse *A. spirorbis* pour la restauration du site minier du Koniambo avec *Tristaniopsis spp.*





## Introduction du Chapitre 3

### Objectif :

Afin d'évaluer les capacités d'*A. spirorbis* à faciliter l'installation d'espèces cibles de restauration écologique, des essais terrains sur des sites dégradés sont menés en utilisant *A. spirorbis* comme plante outil facilitatrice plantée avec des plants cibles de restauration. Cela dans l'objectif de déterminer si *A. spirorbis* peut améliorer le développement des plants cibles et permettre un enrichissement des communautés ectomycorhiziennes qui permettrait une meilleure installation des essences.

### Résultats principaux :

Les résultats de ce chapitre fait l'objet de deux articles en cours de préparation à la soumission.

Trois essais terrains furent mis en place dans le cadre de ce chapitre, mais l'un d'eux ne fut pas mené à termes suites à de graves problèmes techniques qui nécessitèrent son abandon.

Des deux essais restant, l'un a permis d'évaluer la distance d'action d'*A. spirorbis* en place depuis une douzaine d'années sur les espèces cibles : *T. callobuxus* (ectomycorhizien) et *D. viscosa* (endomycorhizien non ectomycorhizien). Il apparaît d'une part que la distance de plantation d'*A. spirorbis* n'a pas d'influence sur le développement des *T. callobuxus*, mais on constate une amélioration pour les *D. viscosa*. D'autre part, même à plus de 10 mètres de distance, les *A. spirorbis* ont transmis une partie de leur cortège ectomycorhizien aux plants cibles ectomycorhiziens : *T. callobuxus*.

Le deuxième essai qui met en jeu plusieurs modalités de parcelles plantées avec deux espèces cibles *T. guillainii* (ectomycorhizien) et *D. viscosa* et l'espèce nurse *A. spirorbis* sur deux types de sols : un stérile minier simple et un enrichi d'une couche de topsoil. Il en ressort que les plants de *D. viscosa* et *A. spirorbis* se développent clairement mieux sur le sol amendé en topsoil comparé au simple stérile minier mais on n'observe pas d'effet sur le développement du à la facilitation. Concernant la diversité ectomycorhizienne, on observe un transfert d'*A. spirorbis* vers *T. guillainii* quel que soit le type de sol, sans pour autant qu'il y est enrichissement. Une dominance des lineages *Thelephoraceae* et *Sclerodermataceae* se met en place

**Conséquences pour l'itinéraire technique :**

Ces résultats nous permettent d'envisager l'utilisation d'*A. spirorbis* en restauration écologique des sites miniers dégradé. Cette utilisation consisterait à se servir d'*A. spirorbis* comme plante facilitatrice pour améliorer l'implantation d'espèces pour la restauration d'un site. Ainsi l'on pourrait mettre en place un itinéraire technique pour initier un processus de restauration écologique des maquis miniers avec *A. spirorbis*. Cet itinéraire consisterait à planter dans un premier temps uniquement des *A. spirorbis*, d'en couper une première partie après quelques années pour planter des essences de restauration écologiques adaptés au site à restaurer en veillant à mêler espèces ectomycorhiziennes et endomycorhizienne, puis de continuer à couper progressivement les *A. spirorbis* et repeupler l'espace ainsi libérer, enfin de recréer à terme une couverture végétale.

**Article 3: Utilisation d'*A. spirorbis*, plante ectomycorhizienne facilitatrice pour initier la restauration écologique d'un site minier dégradé avec des espèces endémiques.**

**Auteurs :** Anne HOULES<sup>1,2</sup>, Magali PATROIS<sup>2</sup>, Laurent VEDI<sup>2</sup>, David HAVET<sup>2</sup>, Bryan VINCENT<sup>3</sup>, Laure HANNIBAL<sup>3</sup>, Philippe JOURAND<sup>3</sup> et Marc DUCOUSSO<sup>4</sup>

**Affiliations :**

<sup>1</sup>CIRAD, UMR082 LSTM, F-34398 Cedex 5, Montpellier, France

<sup>2</sup>Koniambo Nickel SAS, Vavouto, BP 679, 98860 Koné, New Caledonia

<sup>3</sup>IRD, UMR040 LSTM, NC-98848 Noumea Cedex, New Caledonia

<sup>4</sup>CIRAD, Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, IRD/INRA/CIRAD/Montpellier SupAgro/Université Montpellier, TA10C, 34398 Montpellier Cedex 5, France

**Résumé**

Un essai de 1 hectare (1.680 plants) a été mis en place sur le massif du Koniambo en Nouvelle-Calédonie afin de tester les capacités d'*Acacia spirorbis* à initier un processus de restauration écologique des écosystèmes d'altitude dégradés par l'exploitation minière. Dans ce cadre, des plants d'*A. spirorbis* (plante nurse ectomycorhizée), de *Dodonea viscosa* (plante nurse témoin non ectomycorhizée) et de *Tristaniopsis guillainii* (plante cible) ont été plantés en deux temps : 2014 et 2016, suivant différentes modalités. Ces modalités visent à mettre en évidence le rôle d'*A. spirorbis* comme plante nurse via la mise en place d'un réseau commun de mycorhization. Cet essai met en évidence le rôle favorable d'un apport de topsoil sur la croissance d'*A. spirorbis* et de *D. viscosa*. En ce qui concerne la croissance, après 12 mois nous n'avons pas mis en évidence d'effet significatif de la plante nurse sur la plante cible. La diversité des partenaires fongiques ectomycorhiziens a été constatée dans les différentes situations de l'essai, en pépinière et dans les écosystèmes de référence, par séquençage Sanger des ITS. Les analyses de ces données de séquençage nous ont permis de constater les diversités des cortèges ectomycorhiziens associés à *A. spirorbis* et *T. guillainii* dans ces différentes situations et notamment l'existence d'OTUs communes à ces espèces. Ainsi, l'établissement d'*A. spirorbis* est de nature à permettre le développement d'un cortège ectomycorhizien bénéfique à l'établissement et à la croissance d'une plante cible de la restauration écologique : *T. guillainii*.

**Mots clés :** Nouvelle-Calédonie ; Ectomycorhizes ; Topsoil ; Restauration écologique ; Facilitation ; ITS fongiques.

## Introduction

En Nouvelle-Calédonie un hot spot de biodiversité où des contraintes édaphiques fortes ont conduit à l'échec de trop nombreux essais de revégétalisation, la restauration écologique des sites dégradés nécessite des solutions innovantes. Dans ce cadre, des itinéraires techniques de restauration écologiques, fondés sur la facilitation entre plantes en utilisant le système plante nurse/plantes cibles sont en cours de mise au point, notamment par des recherches afin de comprendre les interactions entre les plantes et les microorganismes du sol afin d'optimiser ces itinéraires.

Afin d'améliorer les chances de réussite de la réhabilitation des sites dégradés, les opérateurs ont très tôt compris l'importance des topsoils et inclus leur gestion dans leurs itinéraires techniques. Ainsi, Bordez et al., 2016 ont décrit la diversité des topsoils des écosystèmes d'altitude du massif du Koniambo ; dans sa thèse (Bordez, 2015) l'impact de la conservation en verse de certains de ces topsoils sur leurs propriétés pour la revégétalisation sont décrites. Nonobstant l'importance des topsoils, moins d'un quart des surfaces à restaurer du Koniambo pourront recevoir un apport de topsoil (Leveau, communication personnelle). Dans ces conditions, il faut aussi et nécessairement trouver une solution qui permette de recréer rapidement des conditions édaphiques acceptables pour les plantes cibles de la restauration écologique. Compte tenu de nos connaissances acquises dans le cadre de cette thèse, nous proposons d'apporter des éléments nouveaux pour l'utilisation d'*A. spirorbis* comme plante nurse et aussi de l'importance d'un apport de topsoil lors de la plantation.

Ainsi, afin de répondre à la question : - le potentiel symbiotique, fixateur d'azote et ectomycorhizien d'*A. spirorbis* est-il un atout pour l'utilisation de cette espèce comme plante nurse ? Nous avons mis en place un essai de plantation sur le terrain, en situation réelle d'un maquis d'altitude dégradé par l'activité minière. L'essai a été conçu en deux phases de plantation : une phase d'établissement préalable de la plante nurse pour permettre le développement de son cortège symbiotique, puis une phase d'éclaircie pour la replantation avec une espèce cible de la restauration écologique.

La facilitation pouvant résulter de l'environnement créé par la plante nurse, nous avons sélectionné une espèce qui présente un développement aérien initial relativement semblable à celui d'*A. spirorbis* en sélectionnant *D. viscosa*. Cette espèce, par contre, diffère d'*A. spirorbis* par ses capacités symbiotiques exclusivement

mycorhizienne arbusculaires et donc par son incapacité à former des ectomycorhizes et des nodosités racinaires fixatrice d'azote. L'écosystème d'origine, comme les écosystèmes adjacents au site d'étude étant naturellement dominés par *T. guillainii*, cette espèce, connue pour sa capacité à former des ectomycorhizes avec une diversité de champignons ectomycorhiziens (Waseem et al., 2017), a été choisie comme plante cible de la restauration écologique. Parmi les techniques de restauration écologique, l'apport de topsoil est une pratique courante, notamment pour le stock de semences apporté et également l'apport d'un cortège de microorganismes favorable à la végétation. Ainsi, l'essai a été divisé en deux parties, une moitié de la surface a bénéficié d'un apport de topsoil et l'autre non.

Pour cet essai, des plants de ces trois espèces ont été produits en pépinière afin d'être prêts à planter lorsqu'une pluviométrie jugée suffisante serait atteinte au début de l'année 2014. La seconde phase de l'essai a été mise en place en 2016 après éclaircie des plantations des espèces nurses. Tout au long de cet essai, la croissance des plants a été contrôlée trimestriellement afin de rendre compte de son évolution. A la sortie de pépinière puis ensuite après 12, 18 et 36 mois, la diversité des ectomycorhizes d'*A. spirorbis* et de *T. guillainii* a été caractérisée par séquençage Sanger des ITS des champignons. Cette caractérisation a également été faite sur des *T. guillainii* présents dans les maquis jouxtant la plantation.

Cet essai permettra donc de mieux cerner le potentiel « nurse » d'*A. spirorbis* en apportant des connaissances sur :

- 1- La capacité d'*A. spirorbis* à fournir à la plante cible un environnement favorable à son implantation et son développement ; cette capacité est évaluée également avec une autre espèce morphologiquement proche, *D. viscosa* afin d'évaluer l'importance de la composante symbiotique d'*A. spirorbis*,
- 2- La diversité du cortège ectomycorhizien qui s'établit directement sur stérile minier ou dans un topsoil apporté,

- 3- La diversification au cours du temps du cortège ectomycorhizien d'*A. spirorbis* et l'impact potentiel des écosystèmes naturels encore en place dans l'environnement proche sur cette diversification,
- 4- Les taxons fongiques ectomycorhiziens communs entre *A. spirorbis* et *T. guillainii*, potentiel acteur d'un réseau ectomycorhizien commun,

## Matériels et méthodes

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R (R Development Core Team 2011).

### *Plan expérimental et caractérisation géochimique du stérile minier et du topsoil apporté*

Les plantations ont été réalisées sur une surface d'environ 1ha à une altitude comprise entre 708 et 688 m entre les latitudes 20°59'49,35''S et 20°59'52,15''S et les longitudes 164°47'28,32E et 164°47'23,52E sur la partie exploitée du massif Koniambo. Les conditions environnementales du Koniambo sont décrites dans Perrier et al. (2006). Le site, situé entre deux collines de maquis minier non impacté par l'activité minière avec une pente de l'ordre de 20 m par 100 m parcouru. La végétation initialement présente a été retirée en totalité ainsi que le topsoil mettant à nu des horizons plus profonds qualifiés de stérile minier. Les maquis miniers adjacents sont composés d'une végétation endémique diversifiée, maquis caractérisé par la présence récurrente de *T. guillainii* (Waseem et al., 2017).

Afin d'évaluer au mieux les capacités d'*A. spirorbis* à assurer un rôle de plante nurse, après un sous-solage à 40 cm de profondeur sur l'ensemble du site et épandage d'une couche de 30 cm d'un mélange composé de 1/3 de tout venant rocheux et de 2/3 de latérites, une plantation a été réalisée sur deux types de substrat : 1- directement sur le stérile minier (SM) composé essentiellement de latérites et de blocs de saprolites plus ou moins fragmentées et 2- sur le SM recouvert d'une couche de topsoil de 20 cm (TS), topsoil issu des couches superficiels d'un maquis ligno-herbacée récolté puis stocké 6 mois en verse sur le massif du Koniambo. Des

axes de drainages ont été creusés afin de permettre le bon écoulement des eaux pluviales et éviter les coulées de sols.

Les caractéristiques géochimiques des substrats ont été analysés sur les paramètres : matière organique : matière organique totale (MO), carbone organique (Corg), azote total (Ntot) et rapport C/N ; la disponibilité en eau : pF3 et pF4,2 ; les pH eau et pH KCl ; les éléments échangeables du complexe absorbant : calcium (Ca), magnésium (Mg), potassium (K), sodium (Na), aluminium (Al), manganèse (Mn), hydrogène (H), la somme des éléments Ca, Mg, K et Na, la capacité d'échange cationique (CEC) et le pH Conductivité ; les éléments totaux : P, Fe, Ni, Mn, Cr, Co, Al, Ca, Mg, K, Na, la teneur en silice (SiO<sub>2</sub>) et le rapport Ca/Mg ; les éléments assimilables (extractibles par ICP-DTPA) : Fe, Cu, Zn et Mg.

Le substrat SM est composé de latérites et de saprolites, caractéristique d'un sol pauvre en nutriments et riches en minéraux tels que le chrome, le cobalt, le nickel, le fer.

Les plantations ont été réalisées en deux temps afin d'évaluer l'importance du développement des communautés ectomycorhiziennes d'*A. spirorbis* pour un meilleur transfert de ces partenaires symbiotiques vers les espèces cible. Ainsi la plantation a été réalisée en deux temps : la première partie de la plantation a eu lieu en mars 2014 et la deuxième partie en mars 2016. Les plantations ont suivi dans le cadre de ma thèse jusqu'en mars 2017 ; soit 36 mois pour les arbres issus de la première partie de la plantation et 12 mois pour ceux issus de la deuxième partie de la plantation. L'espèce cible utilisée est *T. guillainii* une myrtacée endémique du maquis minier. Afin d'évaluer la contribution de l'ectomycorhization à l'effet nurse d'*A. spirorbis*, des plants de *D. viscosa* une espèce à mycorhizes arbusculaires et non ectomycorhiziennes, couramment utilisée en restauration écologique pour sa croissance rapide et sont port assez semblable à celui d'*A. spirorbis* dans les premières années de croissance, ont été planté comme plante nurse témoin.

Les huit modalités de plantation des parcelles sont :

- *A. spirorbis* mono-planté en 2014 (36 mois)
- *D. viscosa* mono-planté en 2014 (36 mois)
- *A. spirorbis* co-planté avec *D. viscosa* en 2014 (36 mois)
- *A. spirorbis* en 2014 (36 mois) co-planté avec *T. guillainii* en 2016 (12 mois)
- *T. guillainii* mono-planté en 2016 (12 mois)
- *T. guillainii* et *A. spirorbis* co-plantés en 2016 (12 mois)
- *A. spirorbis* mono-planté en 2016 (12mois)
- Témoin non planté

Trois répétitions de chaque modalité sont répétées sur chaque substrat, SM et TS, ce qui fait un total de 48 parcelles dont 42 plantées. Chaque parcelle mesure 9 m de long sur 6 m de larges. Les 40 plants de chaque parcelle sont plantés avec un écartement de 1 m par 1 m soit une densité de 10.000 plants à l'hectare. Pour les co-plantations, les plants de chaque espèce sont alternés. Ainsi le dispositif comptabilise 1.680 plants. La Figure 1 représente le plan du dispositif de plantation. Après leurs plantations les plants ont été arrosés une fois afin d'éviter un choc de transplantation trop important.





**Figure 1 :** Schéma du dispositif expérimental de la plantation. La partie sur fond vert a reçu un apport de topsoil (TS) et la partie en rose non (SM). Les parcelles élémentaires sont représentées par des rectangles unis (répétition 1), hachurés (répétition 2) et pointillés (répétition 3), de couleur rouge (plantés en 2014) : 1- *A. spirorbis*, 2- *D. viscosa*, 3- *A. spirorbis* + *D. viscosa*, 4- *T. guillainii* ; jaune : 6- *A. spirorbis* (2014), éclaircie 50 %/replantation *T. guillainii* (2016), 7- *D. viscosa*, éclaircie 50 %/replantation *T. guillainii* (2016), 8- *A. spirorbis* + *D. viscosa*, éclaircie 50 %/replantation *T. guillainii* (2016) ; blanche : 5- sol nu. Les traits bleus figurent les drains, l'hexagone bleu, un bassin de décantation des eaux pluviales et la partie grise, la piste d'accès.

### *Suivi du développement de la plantation*

Le développement des 1.680 plants a été contrôlé tous les trois mois par la mesure du diamètre au collet des plants. A l'issue des 36 mois, la totalité des plants morts ou manquant ont comptés afin d'en déduire le taux de survie.

Des boîtes à moustaches représentant la croissance moyenne mensuelle du diamètre au collet des plants permettent d'évaluer l'effet du topsoil et des modalités de plantation sur le développement des plants. Ces représentations graphiques sont appuyées d'un test de Kruskal Wallis réalisés avec l'algorithme « `kruskal.test` » du package R « `stats` ».

### ***Echantillonnage des racines ectomycorhizées***

Des échantillons de racines ectomycorhizées ont été prélevés sur les plants avant et après plantation ainsi qu'en 2014, sur les *T. guillainii* naturellement présents dans les écosystèmes adjacents de la plantation. Ainsi, des prélèvements ont été réalisés en 2014 sur les plants d'*A. spirorbis* et en 2016 sur les plants d'*A. spirorbis* et de *T. guillainii* avant leur plantation. Des prélèvements ont également été réalisés sur les plants d'*A. spirorbis* plantés en 2014, après 18 mois et 36 mois ; et pour les plants d'*A. spirorbis* et de *T. guillainii* plantés en 2016, après 12 mois.

Avant la plantation, sur 10 % des plants sélectionnés aléatoirement, une vingtaine de racines ectomycorhizées sont prélevées. Une fois plantés, 3 plants par parcelles sont prélevés de 20 racines ectomycorhizées. Le temps du transport, les échantillons sont placés dans une solution à 2% de cetyltriméthylammoniumbromide (CTAB), de 100 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 1,4 M NaCl et 20 mM d'EDTA, puis sont conservées à -20°C au laboratoire avant analyse.

Les ectomycorhizes ont été isolées du reste du chevelu racinaire sous loupe binoculaire puis lavées à l'eau milliQ pour les débarrasser au mieux des traces de sol et du CTAB en vue de l'analyse moléculaire.

### ***Analyse moléculaire des ectomycorhizes***

L'ADN des ectomycorhizes isolées a été extrait avec le procédé d'extraction Wizard Genomic DNA Purification (Promega, Charbonnière-les-Bains, France) en suivant le protocole décrit par Carriconde et al. (2008). A partir des ADN ainsi extrait, un fragment d'approximativement 650 pb d'ADN ribosomique est amplifié en utilisant les amorces ITS1F (5'-TTTCCGTAGGTGAACCT-3' ; (Gardes et Bruns, 1993) et ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' ; (White et al., 1990) La réaction de PCR utilisée pour l'amplification est préparée dans un volume total de 25 µL composé de : 1 µL d'ADN dilué au 1/20, 1 µM de chaque amorce, 1,5 unités de Taq polymérase (Promega, Charbonnières, France), 5 µL de buffer 5X Promega Taq polymerase, 2 mM de MgCl<sub>2</sub> et de 200 µM de dNTP Promega. L'amplification est réalisée avec un thermocycleur Eppendorf Mastercycler® (Eppendorf, Hamburg, Germany) programmé comme suit : un cycle de 3 min à 94°C, suivi de 35 cycles de 45 s à 94°C, 45 s à 55°C, 1 min à 72°C et d'une extension final de 10 min à 72°C.

Les produits de PCR sont contrôlés sur un gel d'électrophorèse à 1 % d'agarose (Sigma) à 0,5 % de tampon TBE et 2 µL de bromure d'éthidium (BET, 10 µg/mL pour 100 mL de gel). Un marqueur de taille de 1.000 pb (Promega) est utilisé pour estimer la taille des fragments. Les bandes d'ADN sont ensuite visualisées par fluorescence sous lumière UV. Les échantillons avec des bandes simples, bien définies sont séquencés avec les amorces ITS4 and ITS1 par Genoscreen (Genoscreen, Lille, France) en utilisant l'analyse génétique basé sur l'électrophorèse capillaire ABI3730XL.

### *Analyse des données de séquençage*

Les séquences obtenues sont analysées comme suit : les séquences ITS1 et ITS4 sont analysées et assemblées en contigs suivant l'assemblage De novo avec le logiciel Geneious® 7.1.9 software (Biomatters Ltd.). Les séquences d'ITS sont assignées à des unités taxonomiques opérationnelles (OTU) en utilisant un seuil d'homologie de 97 % entre les séquences, comme indiqué par (Smith et al., 2013) en utilisant le logiciel en ligne CD-Hit Est® (Li et Godzik, 2006). Les OTUs sont ensuite affiliées à un lineage phylogénétique fongique avec l'algorithme BLASTn de NCBI, puis les OTUs identifiées sont ensuite regroupées selon les lineages formellement identifiés comme ectomycorhiziens par Tedersoo et al. (2010).

### *Analyse statistiques de la diversité fongique en fonction des conditions de plantation*

La qualité de l'échantillonnage a été évaluée grâce aux indices de diversité observés et estimés jusqu'à l'asymptote de : la richesse spécifique °D qui permet de compter les taxons sans prendre en compte leur abondance relative, l'indice de diversité de Shannon <sup>1</sup>D qui comptabilise les taxons en proportion de leur abondance et de l'indice de diversité de Simpson 2D qui mesure la probabilité que deux individus sélectionnés au hasard, appartiennent à la même espèce. Ces indices sont calculés avec les algorithmes « ChaoRichness », « ChaoShannon » et « ChaoSimpson » du package R « Inext » (Hsieh et al., 2016).

Des représentations graphiques présentent la composition en lineages fongiques identifiés sous forme de camemberts selon l'espèce hôte et la provenance : *A. spirorbis* ou *T. guillainii* plantés sur l'essai et *T. guillainii* du maquis adjacent. La répartition de ces lineages selon l'hôte (*A. spirorbis* ou *T. guillainii*), le type de sol

(topsoil ou stérile minier), le stade/âge des plantations (t0, 12 mois, 18 mois, 36 mois) et la co-plantation ou non avec une autre espèce.

Des tests Chi2 d'indépendance, réalisés avec l'algorithme « chisq.test » du package R « stats » permettent de comparer les communautés ectomycorhiziennes totales selon l'espèce hôte : *A. spirorbis* ou *T. guillainii* plantés sur l'essai et *T. guillainii* du maquis adjacent, afin de comparer si il y a des différences entre les deux espèces et également si les communautés du maquis adjacent interagissent avec les espèces plantées.

Ces calculs sont appuyés de diagrammes de Venn réalisés avec Venny 2.1 afin de mettre en évidence les OTUs partagés en fonction des espèces hôtes (*A. spirorbis*, *T. guillainii* plantés sur l'essai et *T. guillainii* du maquis adjacent) et selon les types de sols (topsoil, stérile minier et pépinière).

L'influence des composants des sols sur la diversité est évaluée avec un test de Mantel basé sur la corrélation de Pearson avec l'algorithme « vegdist » du package R « vegan » (Jari Oksanen) (Chao et al., 2005).

Une Non-metric Multidimensional Scaling (NMDS) va permettre de représenter sur deux dimensions la répartition des lineages ectomycorhiziennes en fonction de l'hôte et du type de sol. Cette analyse est réalisée avec l'algorithme « metaMDS » du package R « vegan » (Jari Oksanen).

## Résultats

### *Composition géochimique des substrats de plantation*

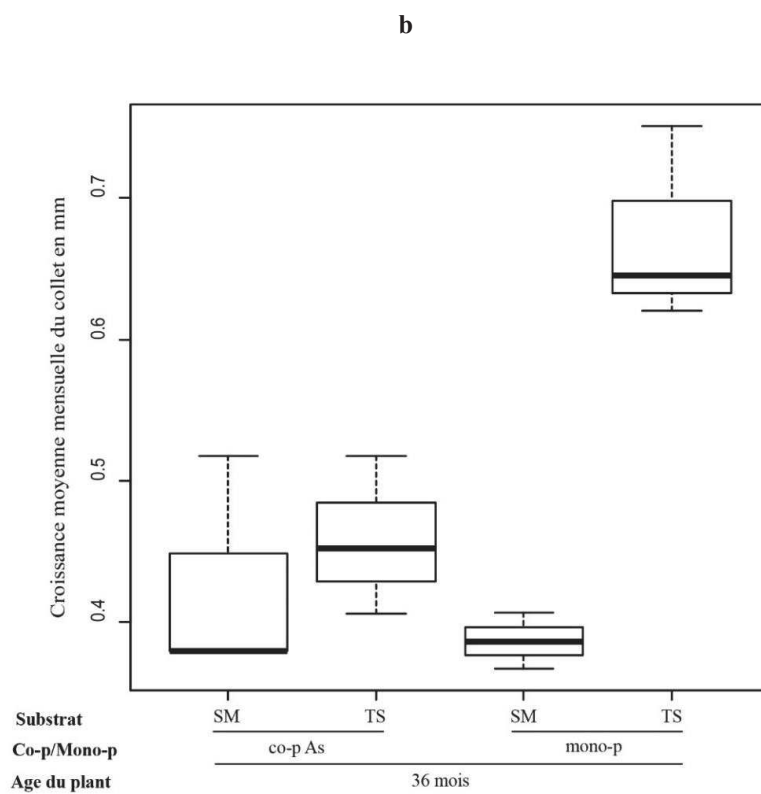
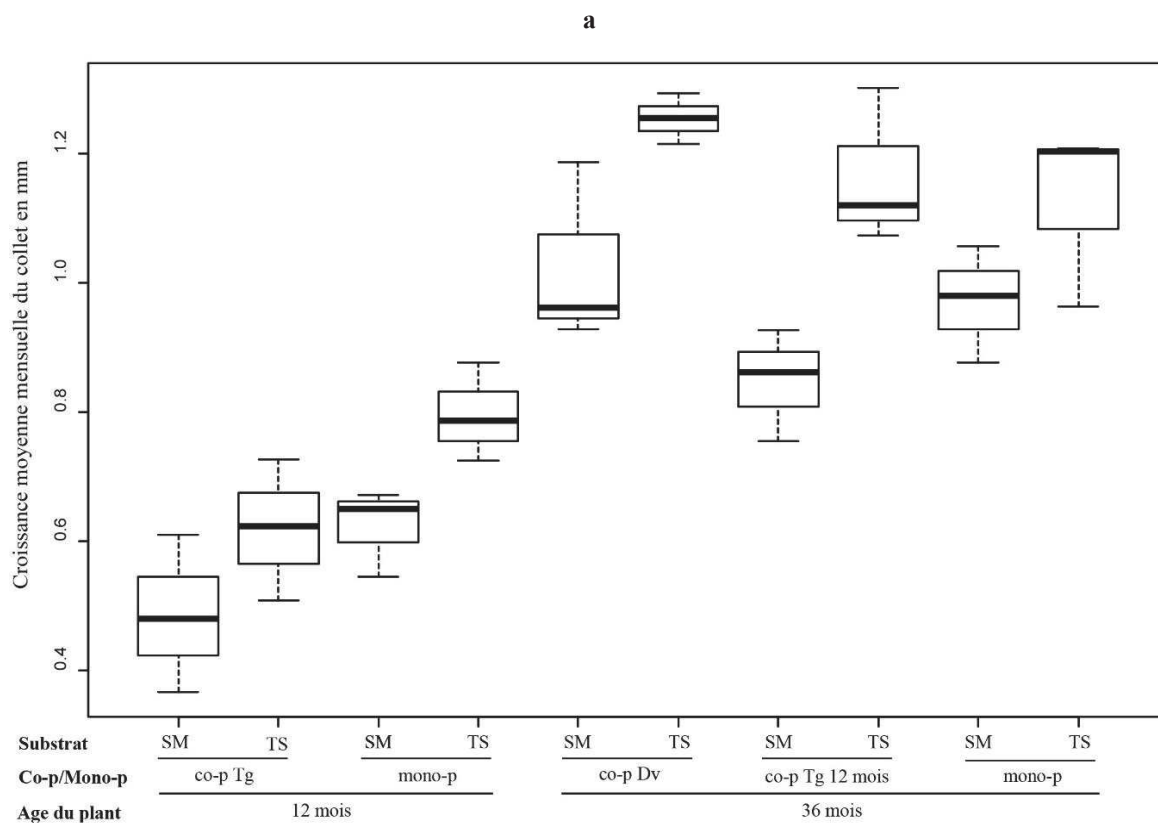
Les analyses géochimiques réalisées sur les deux substrats du site de plantation SM et TS sont présentées à L'ESM Table 1. Le substrat SM présente un contenu deux fois moins riche en matière organique, carbone organique et azote que le substrat TS. Les rapports C/N de TS : 22,393 et SM : 20,543 ne sont pas significativement différents. La disponibilité en eau pF3 et pF 4,2 est plus importante sur TS. Concernant le pH KCl, il est plus élevé sur TS (20,794 contre 17,294) et pour le pH eau bien que proche de la neutralité pour les deux substrats, il est sensiblement plus élevé sur SM (7,10 contre 6,31). Concernant les éléments échangeables, la CEC, le pH Conductivité et le complexe absorbant sont un peu plus élevés sur SM. Les compositions en éléments totaux Cr, Co, Al, Ni, Fe, Mn et Mg sont relativement importante, très caractéristique des latérites et saprolites, les deux substrats ont des teneurs très similaires importantes sauf pour le Ca, le Mg et le K qui sont presque deux fois plus importante sur le substrat SM. Le rapport Ca/Mg est plus de deux fois plus important sur SM que sur TS. Enfin les éléments assimilables sont en quantités bien plus importantes sur TS. Le substrat TS est donc, au sens agronomique, plus riche que le SM.

### *Développement des arbres en fonction du type de substrat et de la présence de l'espèce nurse*

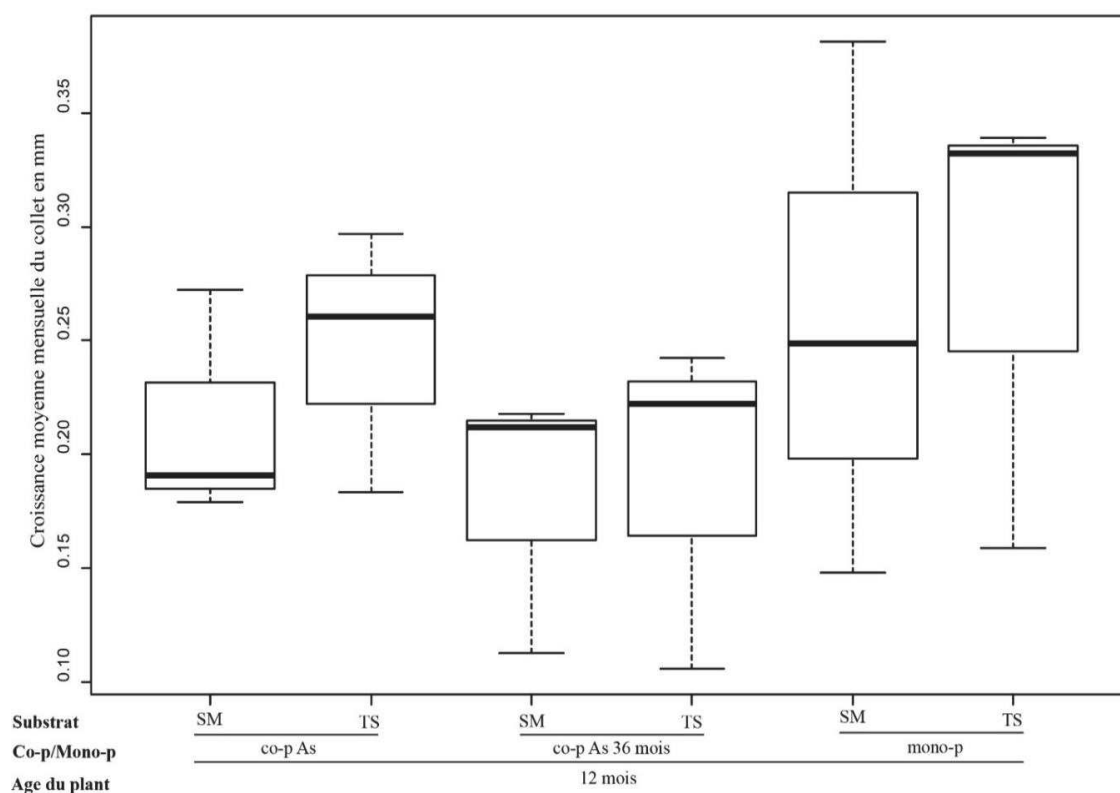
Le test de Kruskal-Wallis entre les deux types de substrats SM et TS est non significatif au risque de 5 % avec un Chi2 de 4,563 et une p-value de 0,03267 pour *A. spirorbis*. Cela signifie que le type de substrat influe significativement sur la croissance des plants d'*A. spirorbis*. Pour *D. viscosa*, le Chi2 est de 5,429 et la p-value de 0,01981 donc au risque de 5 % le test est non significatif. Donc, pour cette espèce, le type substrat influe aussi sur la croissance. Enfin pour *T. guillainii*, le Chi2 est de 0,4386 et la p-value de 0,5078 donc au risque de 5 % le test est significatif. Pour cette espèce, après seulement 12 mois d'une croissance très lente, le type de substrat n'a pas d'influence significative sur la croissance des plants.

La croissance moyenne mensuelle du diamètre au collet des trois espèces mesurées : *A. spirorbis*, *D. viscosa* et *T. guillainii* est présentée Figure 2. Il apparaît qu'*A. spirorbis* a une croissance significativement supérieure sur le sol amendé TS comparé au sol SM (Figure 2.a). Il apparaît également que ce sont sur les arbres plantés

depuis 36 mois que la croissance est la plus importante (0,8 à 1,25 mm/mois) comparé aux arbres plantés depuis 12 mois (0,4 à 0,8 mm/mois ; Figure 2.a). Il apparait le même constat pour les plants de *D. viscosa* qui ont une croissance significativement supérieure sur le sol amendé TS comparé au sol SM (Figure 2.b), notamment pour les parcelles mono-spécifiques (approximativement 0,38 pour SM et 0,65 pour TS. Par contre, pour les parcelles co-plantées avec *A. spirorbis*, l'écart est beaucoup moins important (approximativement 0,38 pour SM et 0,45 pour TS ; Figure 2.b). Pour *T. guillainii*, les différences de croissance sur sol SM et TS ne sont pas significatives différentes (Figure 2.c).



c



**Figure 2 :** Accroissement moyen mensuel du diamètre au collet selon le substrat, la co-plantation avec une espèce et l'âge des plants à compter de leur plantation sur le site des : **a** : *A. spirorbis* ; **b** : *D. viscosa* ; **c** : *T. guillainii* (SM : substrat stérile minier ; TS : substrat stérile minier additionné de topsoil. co-p As : co-planté avec *A. spirorbis* ; co-p As 36 mois : co-planté avec *A. spirorbis* âgé de 36 mois ; cop-p Tg : co-planté avec *T. guillainii* ; co-p Dv : co-planté avec *D. viscosa* ; mono-p : mono-planté).

### *Etat des lieux de la diversité fongique*

La liste des ectomycorhizes échantillonnées est présentée Table 1. Il apparaît que quel que soit l'espèce, le type de sol, la modalité de plantation ou le nombre de mois après plantation les séquences ITS obtenues appartiennent en majorité à des taxons ectomycorhiziens connus.



**Table 1 :** Nombre de séquences ITS obtenues à partir de l'échantillonnage des ectomycorhizes et nombre d'OTUs à 97 % d'homologie formées à partir de ces séquences.

		OTUs 97 %	Séquences
<b>Tous champignons confondus</b>	Total	191	744
	Total	134	682
<b>Champignons ECM</b>	Sur sol SM	61	225
	Sur sol TS	134	265
	Associés aux <i>T. guillainii</i> du maquis	20	26
	Associés aux <i>T. guillainii</i> plantés	54	182
	Associés aux <i>A. spirorbis</i> plantés	78	474

Les indices de diversité (Table 2), indiquent que l'échantillonnage est représentatif à hauteur de 10 à 32 % de la richesse estimée. Avec une richesse spécifique des espèces fongique totale atteignant 26 % de la richesse estimée, et qui atteint 32 % pour les champignons ectomycorhiziens. Sur les sols SM on atteint 18 % de la richesse ectomycorhiziennes estimée et près de deux fois plus sur les sols TS (32 %). Concernant les espèces hôtes, 10 % de la richesse estimées a été échantillonnée pour les *T. guillainii* du maquis adjacent, quand elle atteint 35 % pour les *T. guillainii* plantés et 30 % pour les *A. spirorbis* plantés. Les indices de diversité de Shannon sont presque tous supérieur à 3, sachant que l'indice est généralement échelonné entre 0 et 5, cela traduit une diversité relativement élevée. Concernant l'écart entre l'indice mesuré et l'indice estimé, la différence est inférieure à 1 sauf pour les *T. guillainii* du maquis adjacent. Ainsi pour les échantillons fongiques totaux l'indice de Shannon atteint 4,012 et est légèrement plus faible (3,699) pour les espèces ectomycorhiziennes. Concernant le type de sol, l'indice de Shannon est très légèrement plus élevé sur le sol TS (3,699 contre 3,538 sur sols SM). Pour l'espèce hôte, l'indice de Shannon est très similaire entre *A. spirorbis* (4,221) et *T. guillainii* (4,368). C'est sur les *T. guillainii* du maquis adjacent qu'il est le plus faible (2,996) avec une richesse estimée atteignant presque 5.5.

Enfin, d'après l'indice de Simpson les probabilités d'observer des individus du même taxon sur les communautés associés aux arbres des sols échantillonnés sont très élevées (entre 94 et 96 %). Cette probabilité n'augmente pratiquement pas pour l'indice estimé sauf pour les *T. guillainii* du maquis adjacent pour lesquels cette probabilité atteint 100 %.

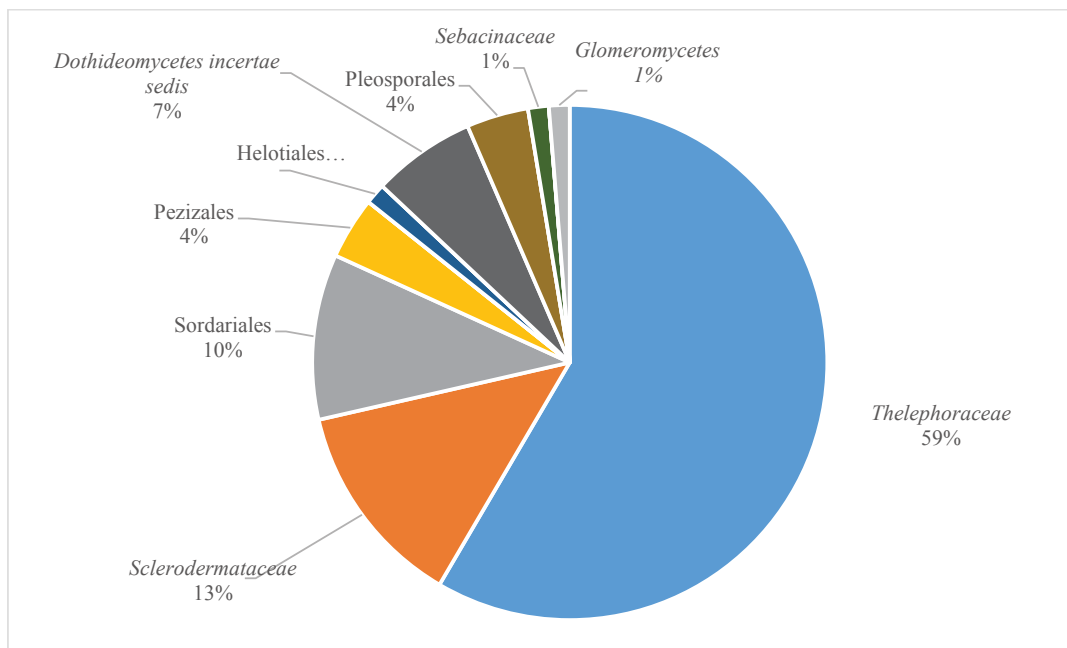
**Table 2 :** Indices de diversité observées et estimées de la distribution des OTUs fungiques totales et ectomycorhiziennes selon l'espèce hôte et le type de sol, basés sur le package R « iNext » (Hsieh *et al.* 2016).

		Richness <sup>0</sup> D		Shannon <sup>1</sup> D		Simpson <sup>2</sup> D	
		Observé	Estimé	Observé	Estimé	Observé	Estimé
Tous champignons confondus	Total	191 (26 %)	750,380	4,012	4,399	0,953	0,954
	Total	134 (32 %)	418,052	3,699	3,956	0,944	0,945
	Sur sol SM	61 (18 %)	334,862	3,538	4,435	0,941	0,949
	Sur sol TS	134 (32 %)	418,052	3,699	3,956	0,944	0,945
Champignons ECM	Associés aux <i>T. guillainii</i> du maquis	20 (10 %)	200,500	2,996	5,498	0,950	1
	Associés aux <i>T. guillainii</i> plantés	54 (35 %)	156,090	3,640	4,368	0,958	0,968
	Associés aux <i>A. spirorbis</i> plantés	78 (30 %)	259,334	3,670	4,221	0,948	0,952

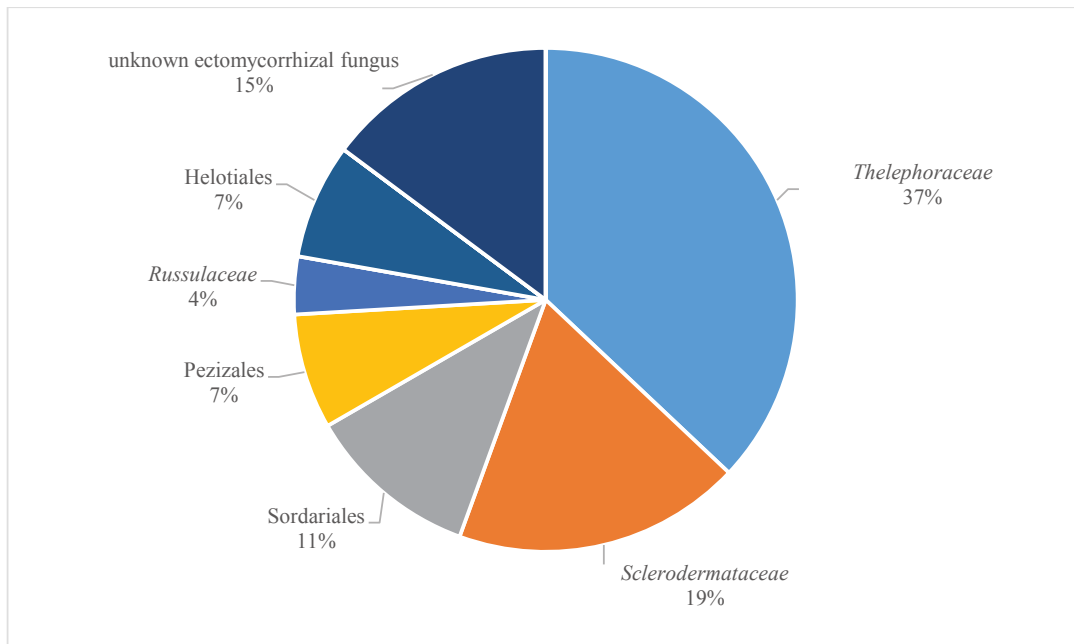
La répartition des principaux lineages ectomycorhiziens échantillonnés sur *A. spirorbis* et *T. guillainii* plantés et en milieu naturel est présentée Figure 3. Pour les deux espèces plantées, on note que les *Thelephoraceae*, les *Sclerodermataceae* et les Sordariales représentent les lineages les plus représentés à hauteur de 59 %, 13 % et 10 % des OTUs ectomycorhiziennes échantillonnées sur *A. spirorbis* (Figure 3a) et 37 %, 19 % et 11 % pour *T. guillainii* (Figure 3b). Pour les *A. spirorbis* plantés (Figure 3a), les lineages minoritaires représentés en proportions inférieurs à 10 % sont les *Dothideomycetes incertae sedis* (7 %), les Pezizales (4 %), les

Pleosporales (4 %), les Helotiales (1 %) et les Sebacinaceae (1 %). Pour les *T. guillainii* plantés (Figure 3b), les lineages minoritaires représentés en proportions inférieurs à 10 % sont les Pezizales, (7 %), les Helotiales (7 %) et les *Russulaceae* (4 %) ainsi que 15 % de champignons ectomycorhiziens non identifiés. Pour les *T. guillainii* du maquis adjacent (Figure 3c), les taxons les plus représentés sont les Helotiales et les *Cortinariaceae* qui représentent respectivement 30 % et 20 % des OTUs. Les *Thelephoraceae* ne représentent que le 3<sup>ème</sup> lineage ectomycorhizien le plus représenté (15 %), suivi des Pezizales (10 %) et des *Russulaceae* (10 %). On note que les *Cortinariaceae* ne sont pas représentés sur les *A. spirorbis* et *T. guillainii* plantés (Figure 3a et b). Les lineages minoritaires représentés en proportions inférieurs à 10 % sont les *Tricholomataceae* (5 %), les Hymenochaetales (5 %) et les *Atheliaceae* (5 % ; Figure 3c), à noter que ces lineages sont également absents sur les *A. spirorbis* et *T. guillainii* plantés (Figure 3a et b).

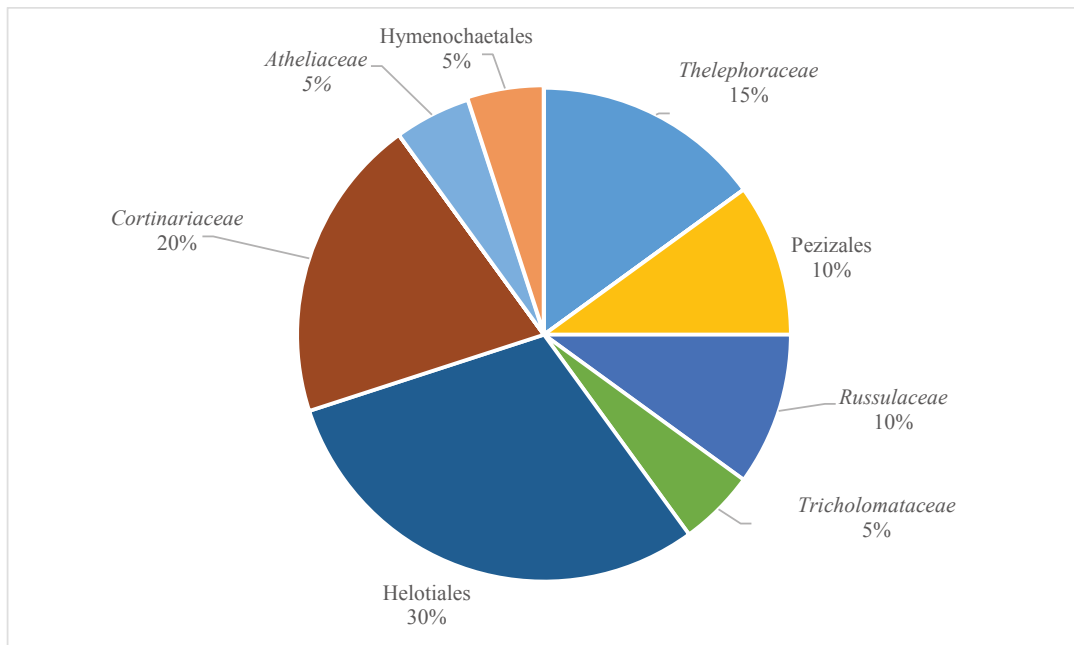
**a**



**b**



**c**

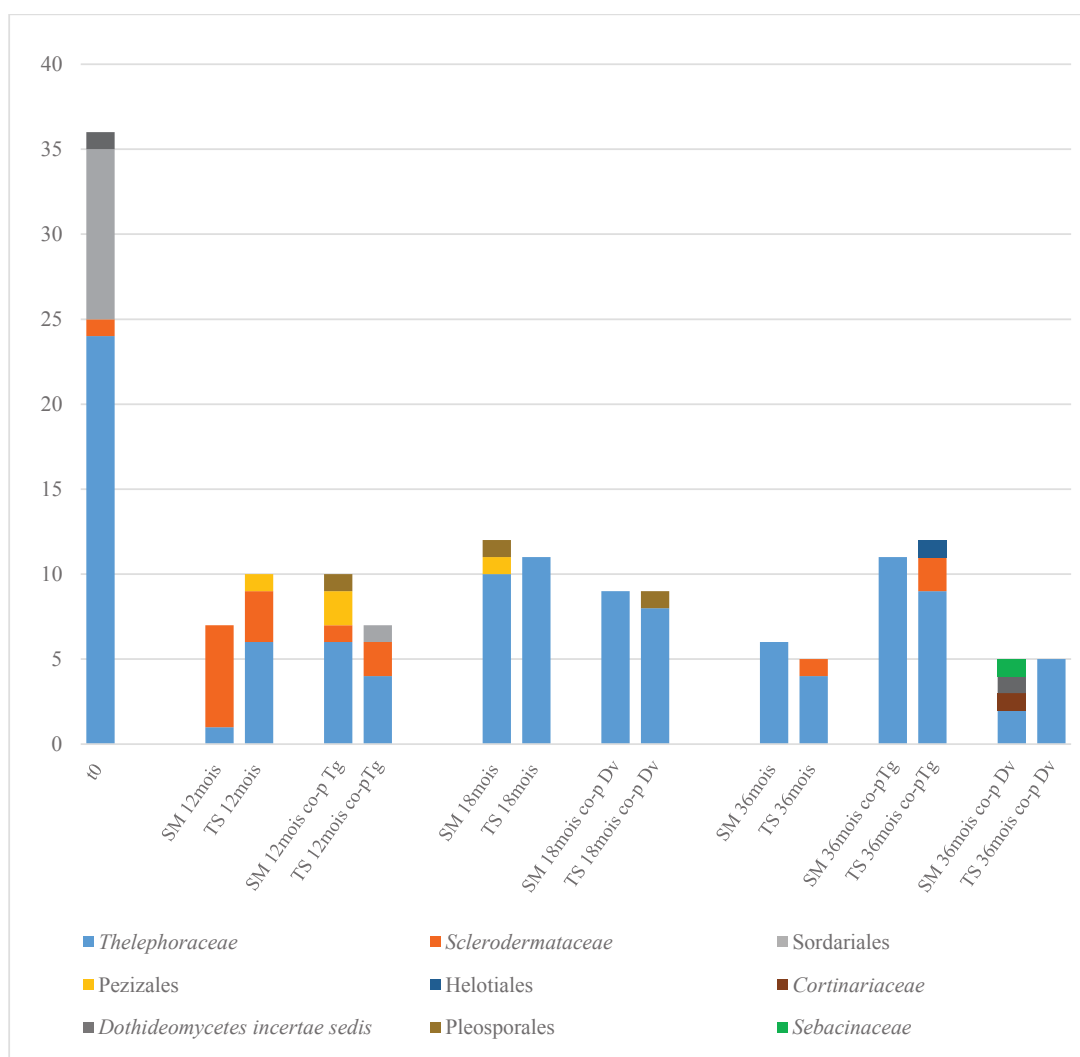


**Figure 3** : Proportions des lineages ectomycorhiziens associés : **a** : à *A. spirorbis* plantés ; **b** : à *T. guillainii* plantés ; **c** : à *T. guillainii* du maquis adjacent

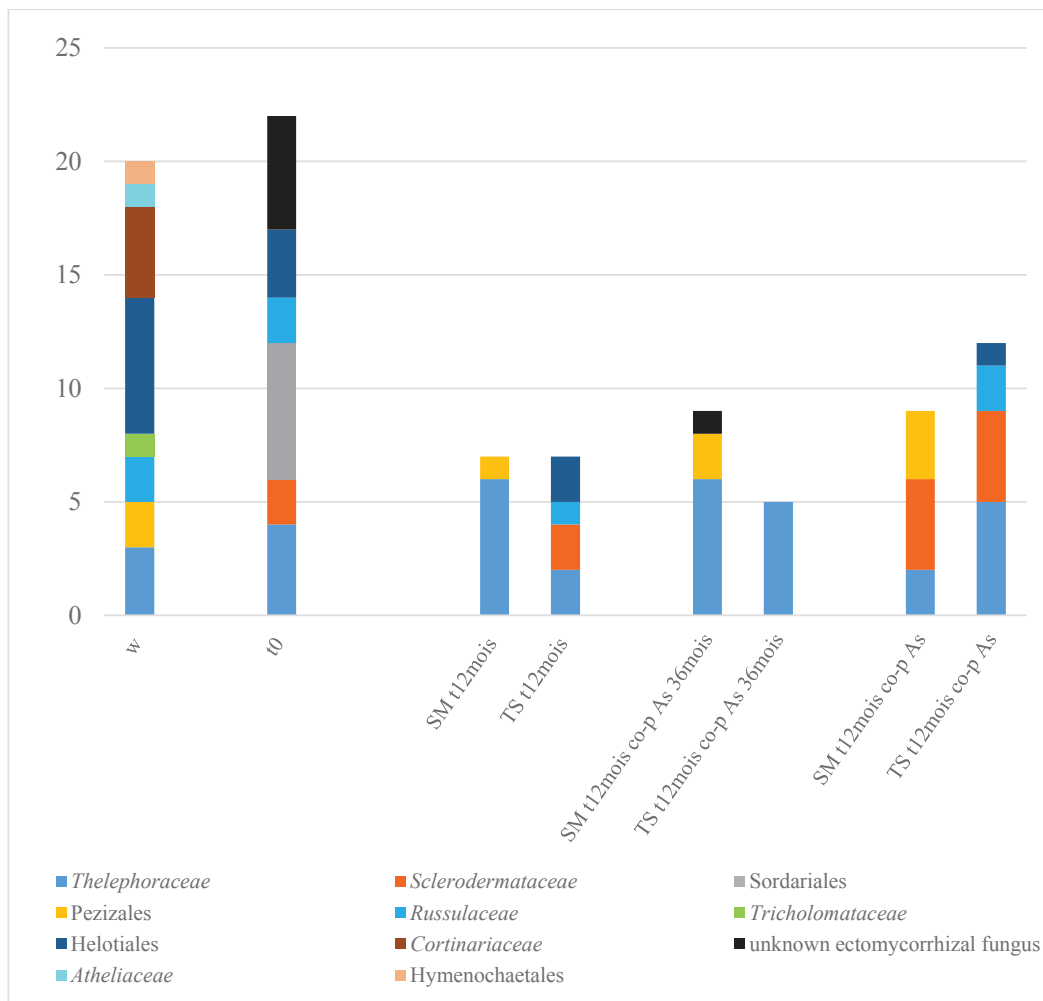
### *Diversité en fonction du type de sol et de la co-plantation*

Les proportions des OTUs des principaux lineages ectomycorhiziens en fonction de l'espèce hôte, du type de sol et de la durée de plantation sont représentées Figure 4.

**a**



**b**



**Figure 4** : Proportions d'OTUs en % des principaux lineages des champignons mycorhiziens associés : **a** : à *A. spirorbis* ; à *T. guillainii* (SM : stérile minier ; TS : topsoil ; co-p Tg : Co-plantation avec *T. guillainii* ; co-p Dv : Co-plantation avec *D. viscosa* ; co-p As : Co-plantation avec *A. spirorbis* ; t0 : plants en pépinière avant plantation ; w : arbres du maquis adjacent).

Pour les *A. spirorbis* (Figure 4a), on note qu'il y a nettement plus d'OTUs identifiées sur les plants avant plantation (37 OTUs) que sur les plants échantillonnés après plantations (entre 5 et 12 OTUs). Par contre, très peu de lineages différents sont représentés à t0 et la plupart sont toujours représentés au cours de l'évolution des plantations. Dans la plupart des modalités, le lineage des *Thelephoraceae* est le plus représenté du début jusqu'à la fin de l'expérience (36 mois). En début d'expérience, le lineage des *Sclerodermataceae* était assez

présent notamment à 12 mois, il est de moins en moins présent par la suite. Les lineages des Sordariales, des Glomeromycetes (mycorhiziens arbusculaires) et des *Dothideomycetes incertae sedis* présents sur les plants en pépinière sont pratiquement inexistant une fois les plants plantés sauf pour les Sordariales qui sont toujours présents après 12 mois sur le substrat TS co-planté avec *T. guillainii*. De nouveaux lineages apparaissent, une fois plantés, les Pezizales, les Pleosporales, les Helotiales, les *Cortinariaceae* et les *Sebacinaceae*. Les Helotiales n'apparaissent que sur *A. spirorbis* en place sur TS depuis 36 mois associés à *T. guillainii* depuis 12 mois. Les *Cortinariaceae* et les *Sebacinaceae* n'apparaissent que sur *A. spirorbis* en place depuis 36 mois avec *D. viscosa* sur SM.

Pour les *T. guillainii* (Figure 4b), on note des proportions d'OTUs, pour les arbres du maquis adjacents et pour les plants de pépinière, deux fois plus importante (respectivement 20 et 22 OTUs) que sur les plants après plantation (entre 5 et 12 OTUs). Sur les arbres du maquis on recense 8 lineages ectomycorhiziens et 6 sur les plants de pépinière, et seulement 3 lineages de communs entre les deux : les Helotiales, les *Russulaceae* et les *Thelephoraceae*. Ces trois même lineages sont retrouvés sur les plants sur TS après 12 mois. On note également la présence de Pezizales sur les plants sur substrat SM alors que ce lineage n'est pas présents à t0 mais est présents sur les *T. guillainii* du maquis adjacent. Les *Sclerodermataceae* présents sur les plants à t0 sont également présents sur les plants après 12 mois, notamment sur ceux co-plantés avec les *A. spirorbis* simultanément. Le lineage des Sordariales présent à t0 est absent de la suite des échantillonnages. Enfin on note que c'est la modalité *T. guillainii* co-plantée simultanément avec *A. spirorbis* qui présente le plus d'OTUs et le plus de lineages différents comparés à t0. On n'observe pas de différences entre les traitements TS et SM en termes de nombre d'OTUs.

Le calcul du Chi<sup>2</sup> d'indépendance de Pearson (Table 3) indique que les communautés associées à *A. spirorbis* et à *T. guillainii* à t0 ont des communautés différentes avec celles des *T. guillainii* du maquis adjacent. (p-values de 0,0390 avec *T. guillainii* et 3,659<sup>e</sup>-13 avec *A. spirorbis*).

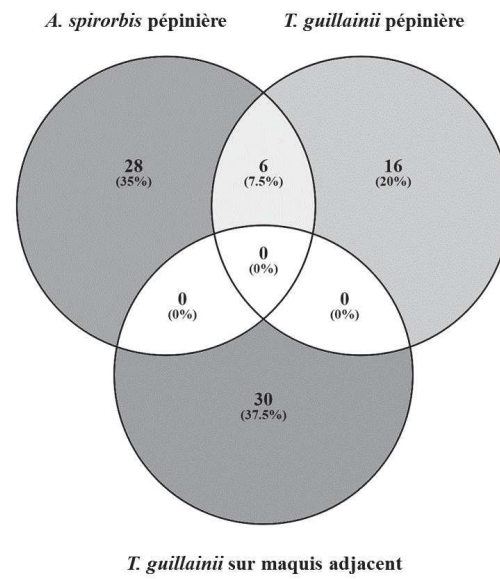
**Table 3 :** Comparaison de la diversité taxonomique des lineages ectomycorhiziens avec le Chi<sup>2</sup> d'indépendance de Pearson entre les *T. guillainii* et les *A. spirorbis* plantés et les *T. guillainii* du maquis. Un test significatif entre deux modalités indique que les communautés ont une distribution indépendantes l'une de l'autre (- : non significatif ; \* : peu significatif ; \*\* : significatif ; \*\*\* : très significatif ; \*\*\*\* : extrêmement significatif).

	<i>T. guillainii</i> maquis	
	p-value	Significativité
<i>T. guillainii</i> plantés	0,0390	**
<i>A. spirorbis</i> plantés	3,659e <sup>-13</sup>	****

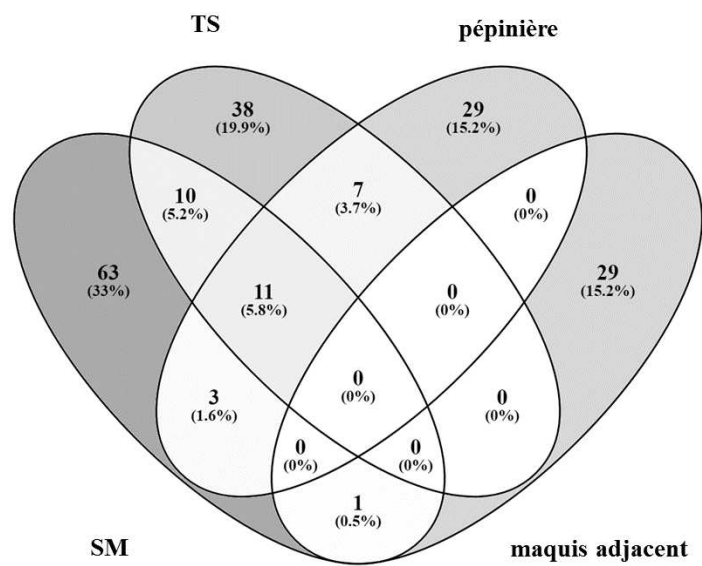
L'état des lieux de la diversité fongique à t0 est représenté sous forme de diagramme de Venn (Figure 5a) : 35 % (28 OTUs) et 20 % (16 OTUs) des OTUs sont respectivement présentes uniquement sur *A. spirorbis* et *T. guillainii* et 37,5 % (30 OTUs) des *T. guillainii* du maquis adjacent. Ce diagramme met en avant 7,5 % d'OTUs communes (6 OTUs) entre les communautés fongiques totales des *A. spirorbis* et des *T. guillainii* provenant des pépinières. On note qu'aucune OTUs n'est commune au *T. guillainii* du maquis adjacent.



**a**

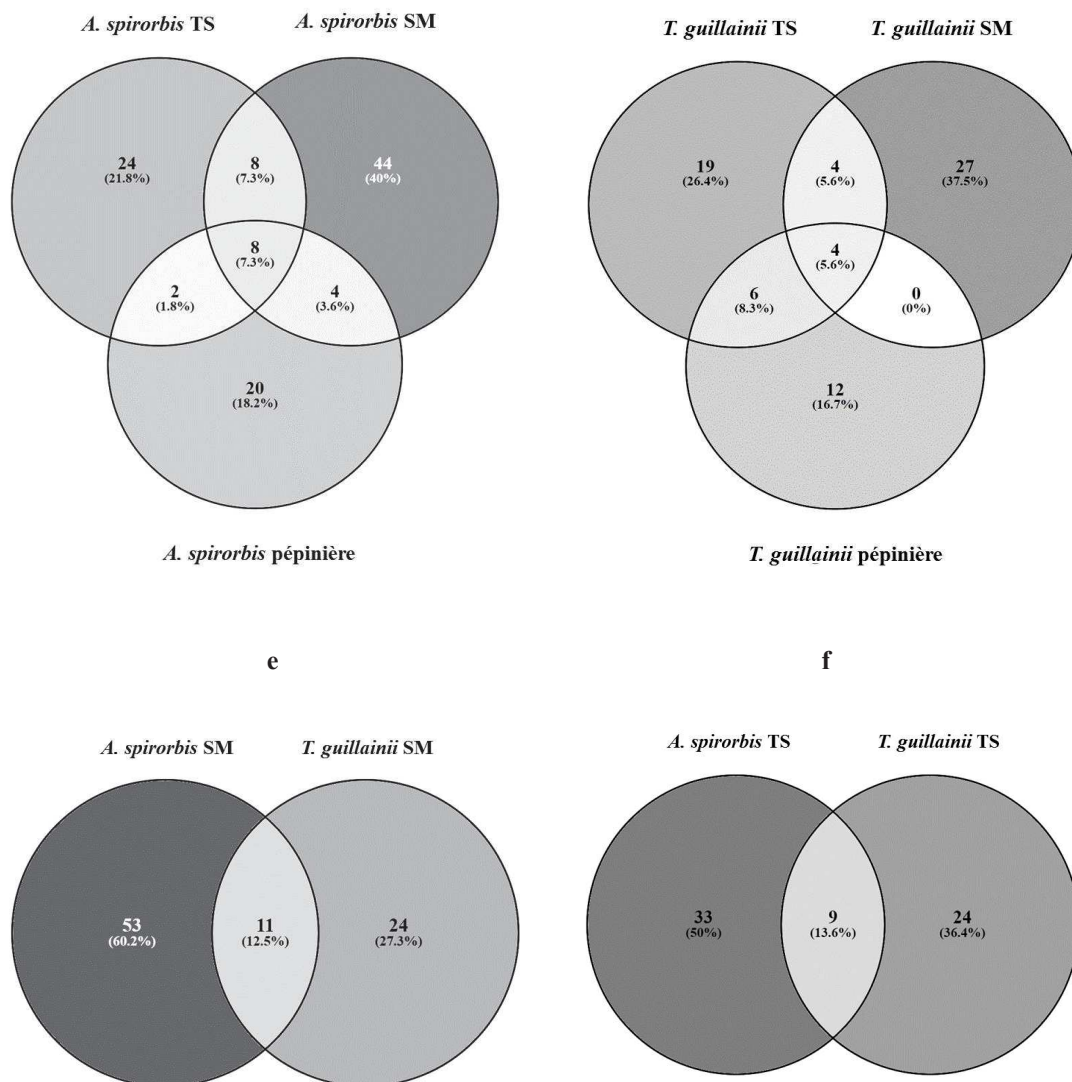


**b**



**c**

**d**



**Figure 5 :** Diagrammes de Venn représentant les OTUs de champignons totaux partagés entre : **a** : *A. spirorbis* et *T. guillainii* en pépinière avant la plantation et les *T. guillainii* du maquis adjacent ; **b** : les individus développés 12 à 36 mois sur substrats SM et TS, en pépinière avant la plantation et sur le maquis adjacent ; **c** : *A. spirorbis* développés en pépinière avant la plantation et après 12 à 36 mois sur TS et SM ; **d** : *T. guillainii* développés en pépinière avant la plantation et après 12 à 36 mois sur TS et SM ; **e** : *A. spirorbis* et *T. guillainii* sur SM ; **f** : *A. spirorbis* et *T. guillainii* sur TS.

Concernant l'influence du site, le diagramme en Figure 5b représente l'état des lieux de la diversité fongique après 36 mois sur différents types de sols comparé à la diversité à t0 et en maquis naturel. Sur sol SM, uniquement 33 % des OTUs (63 OTUs) y sont présentes, 19,9 % (38 OTUs) uniquement sur sol TS, 15,2 % (29 OTUs) à t0 en pépinière et autant sur le maquis adjacent. On observe 11 % d'OTUs présentes sur les substrats TS et SM (21 OTUs) dont 5,2 % d'OTUs communes (10 OTUs) uniquement communes aux arbres sur SM et sur TS et 5,8 % (11 OTUs) communes également aux plants à t0 en pépinière. A t0, 1,6 % (3 OTUs) des OTUs sont communes uniquement aux plants du substrat SM, tandis que 3,7 % (7 OTUs) sont communes avec les plants du substrat TS. Seulement une OTU est partagée entre les plants du maquis adjacent et les plants sur SM.

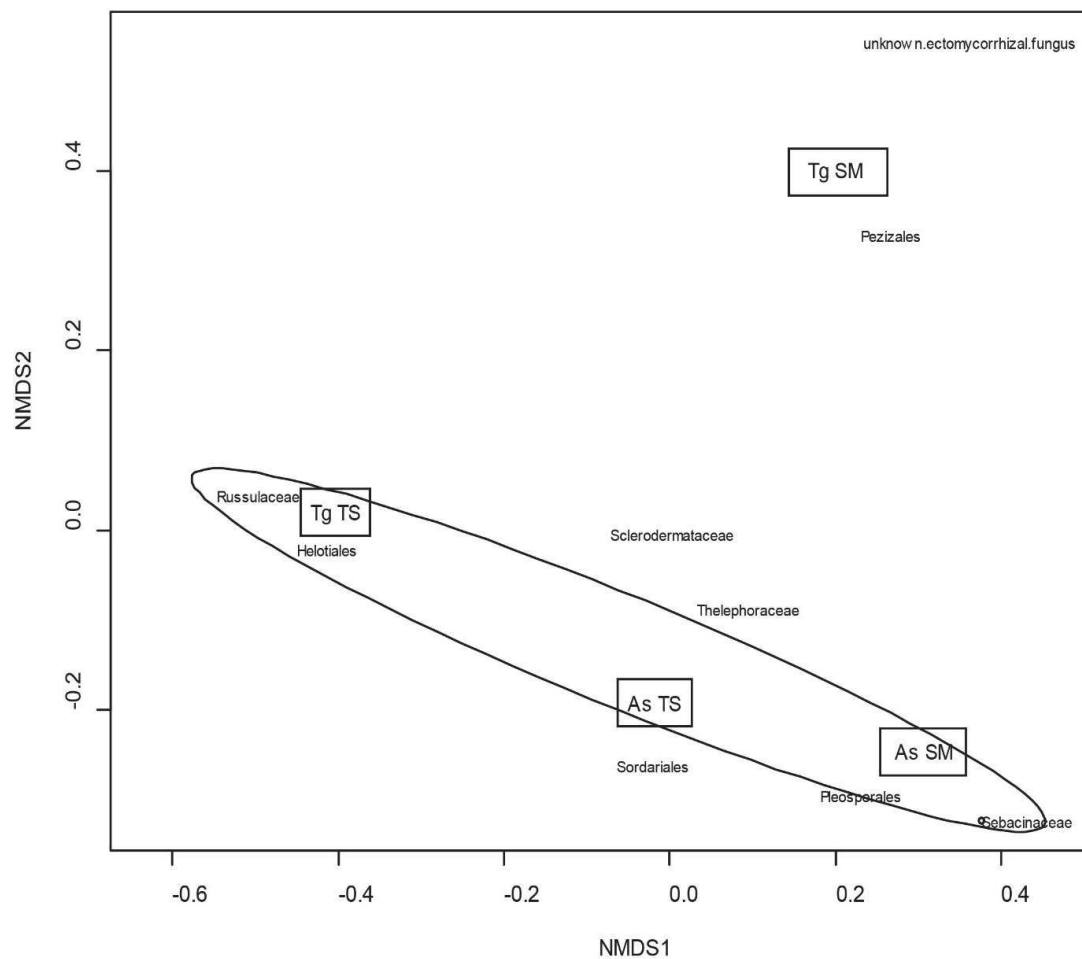
Le diagramme Figure 5c représente la répartition de la diversité pour *A. spirorbis* entre t0 et après 36 mois sur les deux types de substrats. La même répartition avec *T. guillainii* est représentée Figure 5d.

Concernant le comportement des champignons selon l'espèce sur un type de sol en particulier, le diagramme Figure 5e représente la répartition de la diversité entre *T. guillainii* et *A. spirorbis* après 36 mois sur SM. On remarque que 60,2 % des OTUs (53 OTUs) sont présentes uniquement sur *A. spirorbis* et 27,3 % (24 OTUs) uniquement sur *T. guillainii*. Pour le substrat TS (Figure 5f), on remarque que 50 % des OTUs (33 OTUs) sont présentes uniquement sur *A. spirorbis* et 36,4 % (24 OTUs) uniquement sur *T. guillainii*.

Le test de Mantel entre les composants des sols et la diversité ectomycorhizienne des OTUs n'est pas significatif (p-value de 0.67), ainsi il n'y a pas de corrélation entre les composants des sols et la diversité ectomycorhizienne.

La NMDS à deux dimensions de la diversité ectomycorhizienne des OTUs après 36 mois selon l'espèce et le type de sol est présentée Figure 6. Les *A. spirorbis* sur TS et SM et les *T. guillainii* sur TS sont sur la même ellipse de confiance concernant les communautés ectomycorhiziennes, ce qui signifie qu'ils ont des diversités ectomycorhiziennes assez proches caractérisés par les lineages : *Russulaceae*, Helotiales, *Sclerodermataceae*, *Thelephoraceae*, *Sebacinaceae* et Pleosporales. Les *A. spirorbis* sur SM sont surtout caractérisés par les *Sebacinaceae* et les Pleosporales tandis que ceux sur sol TS sont caractérisés par les Sordariales. Les *T. guillainii* sur TS sont caractérisées par les *Russulaceae* et les Helotiales. Les *T. guillainii* sur SM voient leur

communauté ectomycorhiziennes assez différentes de celle des autres et essentiellement caractérisé par les Pezizales.



**Figure 6 :** NMDS (Non-metric Multidimensional Scaling) à deux dimensions de la diversité des lineages ectomycorhiziens en fonction de l'espèce hôte et du type de sol. Le cercle représente l'ellipse de confiance à 97 % des modalités espèce hôte et type de sol. Les encadrés représentent les modalités espèce hôte et type de sol.

## Discussion

La meilleure fertilité du substrat TS comparé à SM vient de l'apport de topsoil, en effet c'est dans les premiers centimètres d'un sol que l'on retrouve la majorité de la matière organique, des nutriments et les micro-organismes (Bordez, 2015). Ainsi, l'amélioration de la vitesse de croissance peut être directement imputée à la présence de topsoil. Le fait que l'on ne constate pas cet effet sur les plants de *T. guillainii* après 12 mois peut être dû au manque de temps ; une observation sur un temps plus long aurait pu donner des résultats différents, mais aussi à la croissance initiale extrêmement réduite de cette espèce et enfin à la qualité des plants, sans doute trop jeune, qui a engendré une mortalité importante suite au choc de transplantation. On constate donc que les plants se développent globalement bien mieux sur le sol amendé en topsoil, ce qui est en accord avec les études sur l'utilisation du topsoil en restauration écologique (Bordez, 2015 ; Koch et al., 1996). Quand cela est possible, l'utilisation des topsoils est donc à recommander.

Cet essai a révélé une diversité fongique notamment ectomycorhizienne suffisamment représentative pour être extrapolée (Chao et al., 2016) malgré le fait qu'elle ne soit pas représentative de la majorité de la richesse spécifique estimée.

Le fait que les *Thelephoraceae* et les *Sclerodermataceae* soient les lineages ectomycorhiziens les plus représentés, est en accord avec l'étude sur la diversité ectomycorhizienne associée à *A. spirorbis* sur des sols contrastés en Nouvelle-Calédonie, étude faisant l'objet du Chapitre 1 de cette thèse. Sur l'ensemble de l'aire de distribution d'*A. spirorbis* en Nouvelle-Calédonie, les *Thelephoraceae* représentent le lineage dominant avec 28 % des OTUs ectomycorhiziennes. Dans le cadre de notre essai, les *Thelephoraceae* représentent 59 % des OTUs ectomycorhiziennes. Cette dominance des *Thelephoraceae* n'est pas un phénomène isolé, les *Thelephoraceae* sont reconnus pour leur caractère commun et dominant, leur capacité a dominé dans des environnements très différents (Hilszczanska et Zbigniew, 2006 ; Jakucs et Er, 2008; Peintner et Dämmrich, 2012). Pour les *Sclerodermataceae*, ils avaient déjà fait l'objet d'études sur le Koniambo avec *Pisolithus albus* (Jourand et al., 2010). Cette espèce a été mentionnée comme fréquente dans les maquis miniers du massif du Koniambo et reconnue pour son rôle dans l'adaptation de sa plante hôte à la toxicité du nickel (Jourand et al., 2014).

On constate que les plants d'*A. spirorbis* et de *T. guillainii* après plantation présentaient une diversité moins importante qu'au départ, cette différence peut s'expliquer par le stress engendré lors de la transplantation, mais également au fait que l'échantillonnage est plus facile à contrôler sur des plants élevés en pot qu'une fois mis en terre et que le système racinaire se soit développé. Malgré cela, on constate que pour *A. spirorbis*, la plupart des lineages sont présents entre t0 et les échantillonnages après plantations. On assiste donc, pour cette espèce, à une réduction de la diversité en termes d'OTUs de façon relativement homogène sur l'ensemble de lineage. Toutefois, on note une bonne conservation des OTUs communes avec *T. guillainii*. Ainsi les *A. spirorbis* ont su conserver une part leur diversité fongique ectomycorhizienne, malgré une perte de richesse en terme d'OTUs. Ce constat n'est pas aussi net pour *T. guillainii*, qui a subi une perte de la diversité plus importante puisqu'on ne retrouve plus une partie des lineages entre t0 et après 12 mois. Ainsi, même si il y a eu une perte de la diversité ectomycorhizienne, perte dont nous ignorons les effets sur la physiologie des plantes hôtes, nous constatons qu'*A. spirorbis* permet le maintien d'une diversité plus élevée notamment d'OTUs partagés avec *T. guillainii*. Ce partage potentiel du cortège mycorhizien d'*A. spirorbis* est de nature à permettre un effet « nurse » de cette espèce.

On constate également qu'il n'y a eu aucun transfert entre les communautés ectomycorhiziennes des *T. guillainii* du maquis adjacents et celles des arbres de la plantation, compte tenu du laps de temps, 12 mois, ce résultat est attendu car les phénomènes de dispersion naturelle des ectomycorhizes sur des distances, de quelques centaines de mètres restent rare. En effet, un système dégradé, même si il est adjacent à un écosystème intact va mettre beaucoup de temps à recouvrer l'état de résilience notamment du fait d'une modification du fonctionnement des vecteurs naturels de propagations des champignons ectomycorhiziens : le sol, l'eau, les animaux (micromammifères, oiseaux, insectes, etc.). L'acte de restauration écologique va permettre d'accélérer ce processus de résilience en palliant notamment les dysfonctionnements des vecteurs de dispersion (Aronson et al., 2006 ; L'Huillier *et al.*, 2010).

Concernant le processus de facilitation, on observe des OTUs communes entre les *A. spirorbis* et les *T. guillainii* plantés. On note également que les *T. guillainii* co-plantés avec *A. spirorbis* sont ceux ayant le plus de lineages et d'OTUs. On peut donc émettre l'hypothèse que la présence d'*A. spirorbis* a permis aux *T. guillainii* de mieux développer leurs cortèges ectomycorhiziens et qu'il y a potentiellement mise en place d'un

réseau commun de mycorhization entre *A. spirorbis* et *T. guillainii* ; ce réseau étant supporté par *A. spirorbis*. On peut y voir un phénomène de facilitation de la part d'*A. spirorbis* pour *T. guillainii*. Ce constat a déjà été remarqué (Padilla et Pugnaire, 2006). Mais comme dans l'étude (Henry, 2015), on constate que malgré la présence de l'espèce nurse et la potentielle amélioration du cortège ectomycorhizien il n'y a pas d'amélioration sur le développement des plants cibles donc il n'est à proprement parlé, pas question de facilitation. Il est possible que l'absence d'amélioration du développement des *T. guillainii* soit due à une période de co-plantation trop courte ou à un état initial trop précoce des *T. guillainii* au moment de la plantation.

Enfin, on constate sur cette étude que le sol et ses composés géochimiques n'ont pas d'impact significatif sur les compositions des communautés ectomycorhiziennes malgré un effet très significatif du type de sol sur le développement des plants.

## Références bibliographiques

- Aronson, J., Clewell, A.F., Blignaut, J.N., and Milton, S.J. (2006). Ecological restoration : A new frontier for nature conservation and economics. *14*.
- Bordez, L. (2015). Stratégies de re-végétalisation des maquis miniers nickélifères de Nouvelle-Calédonie : étude sur les potentiels biologiques des topsoils et leur gestion en vue de leur utilisation pour la restauration écologique du milieu dégradé. Université de la Nouvelle-Calédonie- École doctorale du Pacifique ED469.
- Bordez, L., Jourand, P., Ducouso, M., Carriconde, F., Cavaloc, Y., Santini, S., Claverie, J.M., Wantiez, L., Leveau, A., and Amir, H. (2016). Distribution patterns of microbial communities in ultramafic landscape: A metagenetic approach highlights the strong relationships between diversity and environmental traits. *Mol. Ecol.* 2258–2272.
- Carriconde, F., Gardes, M., Jargeat, P., Heilmann-Clausen, J., Mouhamadou, B., and Gryta, H. (2008). Population evidence of cryptic species and geographical structure in the cosmopolitan ectomycorrhizal fungus, *Tricholoma scalpturatum*. *Microb. Ecol.* 56, 513–524.
- Chao, A., Chazdon, R.L., Colwell, R.K., and Shen, T.-J. (2005). A new statistical approach for assessing similarity of species composition with incidence and abundance data. *Ecol. Lett.* 8, 148–159.
- Chao, A., Chiu, C.H., and Jost, L. (2016). Statistical challenges of evaluating diversity patterns across environmental gradients in mega-diverse communities. *J. Veg. Sci.* 27, 437–438.
- Gardes, M., and Bruns, T.D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes, application to the identification of mycorrhiza and rusts. *Mol. Ecol.* 2, 113–118.
- Henry, C. (2015). Stimuler les communautés mycorhiziennes par des plantes nurses pour la restauration écologique: exemple d'une forêt tropicale malgache après exploitation minière. AgroParisTech.
- Hilszczanska, D., and Zbigniew, S. (2006). Persistence of ectomycorrhizas by *Thelephora terrestris* on outplanted Scots pine seedlings. *Acta Mycol.* 41, 313–318.
- Hsieh, T.C., Ma, K.H., and Chao, A. (2016). iNEXT: An R package for rarefaction and extrapolation of species



diversity (Hill numbers). *Methods Ecol. Evol.*

- Jakucs, E., and Er, Z. (2008). Morphological-anatomical characterization and identification of *Tomentella* ectomycorrhizas. *Mycorrhiza* 277–285.
- Jourand, P., Ducousso, M., Reid, R., Majorel, C., Richert, C., Riss, J., and Lebrun, M. (2010). Nickel-tolerant ectomycorrhizal *Pisolithus albus* ultramafic ecotype isolated from nickel mines in New Caledonia strongly enhance growth of the host plant *Eucalyptus globulus* at toxic nickel concentrations. *Tree Physiol.* 30, 1311–1319.
- Jourand, P., Hannibal, L., Majorel, C., Mengant, S., Ducousso, M., and Lebrun, M. (2014). Ectomycorrhizal *Pisolithus albus* inoculation of *Acacia spirorbis* and *Eucalyptus globulus* grown in ultramafic topsoil enhances plant growth and mineral nutrition while limits metal uptake. *J. Plant Physiol.* 171, 164–172.
- Koch, J.M., Ward, S.C., Grant, C.D., and Ainsworth, G.L. (1996). Effects of bauxite mine restoration operations on topsoil seed reserves in the jarrah forest of Western Australia. *Soc. Ecol. Restor.* 4, 368–376.
- Li, W., and Godzik, A. (2006). Cd-hit: A fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics* 22, 1658–1659.
- Padilla, F.M., and Pugnaire, F.I. (2006). The role of nurse plants in the restoration of degraded environments. *Front. Ecol. Environ.* 4, 196–202.
- Peintner, U., and Dämmrich, F. (2012). *Tomentella alpina* and other tomentelloid taxa fruiting in a glacier valley. 109–119.
- Smith, M.E., Henkel, T.W., Uehling, J.K., Fremier, A.K., Clarke, H.D., and Vilgalys, R. (2013). The Ectomycorrhizal Fungal Community in a Neotropical Forest Dominated by the Endemic Dipterocarp *Pakaraimaea dipterocarpacea*. *PLoS One* 8, 1–13.
- Tedersoo, L., May, T.W., and Smith, M.E. (2010). Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: Global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza* 20, 217–263.
- Waseem, M., Ducousso, M., Prin, Y., Domergue, O., Hannibal, L., Majorel, C., Jourand, P., and Galiana, A.

(2017). Ectomycorrhizal fungal diversity associated with endemic *Tristania* spp. (Myrtaceae) in ultramafic and volcano-sedimentary soils in New Caledonia. *Mycorrhiza*.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J.W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White., eds. (New York), pp. 315–322.

### **Logiciels utilisés**

**CD-Hit Est®** : <http://weizhongli-lab.org/cd-hit/>

**R software** : <https://www.r-project.org/>

**Venny 2.1** : Oliveros, J.C. (2007-2015) Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams. <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>

**ESM Table 1** : Principales caractéristiques géochimiques des substrats : Stérile Minier (SM) et Stérile minier amendé d'une couche de topsoil (TS) de l'essai. Les valeurs en gras sont les plus élevées.

		TS	SM
<b>Matière organique</b>			
Matière organique	%	<b>1,007</b>	0,620
Carbone organique	%	<b>0,583</b>	0,360
Azote total	‰	<b>0,277</b>	0,170
C/N		20,543	<b>22,383</b>
<b>Disponibilité de l'eau</b>			
pF3	%	<b>32,557</b>	26,340
pF4,2	%	<b>23,513</b>	18,447
<b>Calcimétrie-pH</b>			
pH (KCl)		<b>20,794</b>	17,294
pH (H <sub>2</sub> O)		6,313	<b>7,097</b>
<b>Complexe absorbant</b>			
Ca	me/100g	0,343	<b>0,667</b>
Mg	me/100g	3,053	<b>3,807</b>
K	me/100g	0,037	0,037
Na	me/100g	0,103	0,1
Al	me/100g	<0,01	<0,01
Mn	me/100g	<0,01	<0,01
H	me/100g	<0,01	<0,01
S(Ca, Mg, K, Na)	me/100g	3,537	<b>4,610</b>
CEC	me/100g	2,670	<b>3,413</b>
TS	%	133,627	<b>144,667</b>
pHCo		6,227	<b>6,817</b>
<b>Eléments totaux</b>			
P	mg/kg	429,3	429,3
Fe	mg/kg	<b>494000</b>	484167
Ni	mg/kg	<b>11050</b>	9407
Mn	mg/kg	<b>9570</b>	7810
Cr	mg/kg	14541	<b>16764</b>
Co	mg/kg	1558	<b>1578</b>
Al	mg/kg	23458	<b>24475</b>
Ca	mg/kg	455,8	<b>809,2</b>
Mg	mg/kg	17592	<b>29050</b>
Ca/Mg		210,5	<b>488,0</b>
K	mg/kg	268,4	<b>482,1</b>
Na	mg/kg	<b>9,943</b>	8,670
SiO <sub>2</sub>	mg/kg	<b>9,9433</b>	8,670
<b>Eléments assimilables (DTPA)</b>			
Fe	mg/kg	<b>2,647</b>	1,983
Cu	mg/kg	<b>0,047</b>	0,023
Zn	mg/kg	<b>0,093</b>	0,030
Mg	mg/kg	<b>6,707</b>	1,677



**Article 4: Ectomycorrhizal facilitation using *Acacia spirorbis* Labill. as nurse plant enable to enhance ectomycorrhizal community composition of a target species: *Tristaniopsis callobuxus* Brongn. & Gris**

**Authors' names:** Anne HOULES<sup>1,2</sup>, François JOUSSEMET<sup>1,2</sup>, Laure HANNIBAL<sup>3</sup>, Magali PATROIS<sup>2</sup>, Laurent VEDI<sup>2</sup>, Philippe JOURAND<sup>3</sup>, Marc DUCOUSSO<sup>4\*</sup>

**Affiliations:**

<sup>1</sup>CIRAD, UMR082 LSTM, F-34398 Cedex 5, Montpellier, France

<sup>2</sup>Koniambo Nickel SAS, Vavouto, BP 679, 98860 Koné, New Caledonia

<sup>3</sup>IRD, UMR040 LSTM, NC-98848 Noumea Cedex, New Caledonia

<sup>4</sup>CIRAD, Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, IRD/INRA/CIRAD/Montpellier SupAgro/Université Montpellier, TA10C, 34398 Montpellier Cedex 5, France

**Corresponding author\*:**

marc.ducouso@cirad.fr

Tel: +33 (0)7 82 01 61 06

## Abstract

Rehabilitating nickel mines in New Caledonia is a major concern. In such extreme soil conditions, mycorrhizal symbiosis is even more important for tree growth, survival and resistance. To be able to propose technical itineraries capable of improving ecological restoration in New Caledonia, transplanted ectomycorrhizal (ECM) saplings need to rapidly acquire a wide range of ECM fungi to improve their survival and growth. To this end, we transplanted ECM seedlings of *Tristaniopsis callobuxus* and non-ECM *Dodonaea viscosa* as control, from the nursery to bare ferrallitic soils harbouring some scattered 12-year-old *Acacia spirorbis* as potential ECM nurse plants. Using molecular characterisation of ITS rDNA, we characterised ECM fungal communities of *A. spirorbis*, *T. callobuxus* saplings at transplantation and 13 months after transplantation and also of ECM *T. guillainii* naturally present in the surrounding ecosystem. We observed changes in the composition of fungal communities of *T. callobuxus* with an increase in diversity, notably the appearance of operational taxonomic units (OTUs) affiliated with */russulaceae*, */boletus* and */pisolithus-scleroderma* and a decrease in ubiquitous nursery ones such as */sebacinales*, */helotiales*. We also observed an increase in the number of shared OTUs between *T. callobuxus* and *A. spirorbis*. The vicinity of *A. spirorbis* significantly increased the survival rate of *Dodonaea viscosa*, and enabled diversification and adaptation of the *T. callobuxus* ECM fungal community. These two results lead us to recommend *A. spirorbis* as a good candidate nurse plant in the framework of ecological restoration of mine sites.

## Keywords

Forest nursery; Ectomycorrhizal community; *Acacia spirorbis*; *Tristaniopsis*; New Caledonia; Fungal ITS; Nurse plant

## Introduction

Tropical ecosystems have been the subject of far fewer studies than temperate ecosystems (Alexander and Selosse 2009), and our knowledge of the unique New Caledonian ecosystem is extremely new and fragmentary (L'huillier et al. 2010). Recent works by our team revealed the importance of the ectomycorrhizal (ECM) symbiosis in New Caledonia (e.g. Amir and Ducousso 2010) and new genera of ECM trees and shrubs were described (Ducousso et al. 2004; 2008). Given that ecosystem degradation is a major problem in New Caledonia, an archipelago considered as a world biodiversity hot spot (Myers et al. 2000; Isnard et al. 2016), it is particularly important to continue improving our knowledge in this domain. In this context, studies on the use of trees to rehabilitate mine sites began in the 1970s (Jaffré et al. 1994). Since then, only two tree species, *Acacia spirorbis* Labill. and *Casuarina collina* J. Poiss. Ex Pancher & Sebert have been shown to be able to grow in such extreme soil conditions (Cherrier 1990), mainly major plant nutrient deficiencies (N, P, K), a highly unbalanced Ca:Mg ratio (1:40) and high concentrations of several heavy metals (Co, Cr, Fe, Mn, Ni). However these two tree species are not naturally present in most original mine ecosystems nor they do enable the spontaneous return of the original native endemic species. Thus, even if these two species grow well in these adverse conditions, they do not provide satisfactory ecosystem services, notably because natural plant successions do not occur spontaneously (McCoy et al. 1999; Wulff et al. 2013). To test the setting of a controlled plant succession, we took the opportunity to use the remains of a 12-year-old field plantation of *A. spirorbis* where mortality after planting had left some scattered isolated trees on bare soil surrounded by the native endemic ecosystem locally dominated by the ECM *Tristaniopsis guillainii* Vieill. ex Brongn. & Gris. In these conditions, considering the vicinity of sources of ECM fungal propagules and the dispersal abilities of ECM propagules (Peay et al. 2012), we assumed that natural diversified ECM inoculums would not be a limiting factor for nursery saplings being colonised by the variety of established ECM fungi. However, the conditions in nurseries, i.e. confined space, highly fertile soil, sometimes the use of fungicides and abundant watering prevent mycorrhizal interactions (Vaario et al. 2009; Kazantseva et al. 2009), which mostly involve opportunistic species with high dispersal abilities (El Karkouri et al. 2005; Trocha et al. 2006; Fernández et al. 2013). As result, ECM fungal communities associated with nursery saplings are generally markedly different from those encountered in the field (Henry et al. 2017). Transplanting from the nursery to the natural

environment has been widely studied especially in the framework of controlled inoculation trials using selected ECM fungal strains (e.g. Selosse et al. 1998; El Karkouri et al. 2002). Nevertheless, after planting, opportunistic nursery species have to make way for indigenous ones to ensure the survival and development of the saplings. In these conditions, following Walker and del Moral (2003), who defined facilitation as any positive influence of one species on another, we hypothesised that a species such as *A. spirorbis* could act as ECM facilitator (Nara and Hogetsu 2004) for another species such as *Tristaniopsis callobuxus* Brongn. & Gris. ECM facilitation is effective only if most ECM fungi are not specific (e.g. Richard et al. 2005; Ryberg et al. 2009; Diédhiou et al. 2010; Smith et al. 2011, 2013). We thus needed to check the ability of ECM fungal species associated with *A. spirorbis* to associate with *T. callobuxus*. We also needed to check the ability of *A. spirorbis* to act as a nurse plant using a non-ECM tree species, *Dodonaea viscosa* Jacq, which is able to form arbuscular mycorrhizas (AM; Wang and Qiu 2006) and thus benefit, like *T. callobuxus*, from the AM network established by *A. spirorbis*. In this study, we did not attempt to observe any changes in AM fungal communities before and after planting.

The remains of a 12-year-old plantation of *A. spirorbis* established on bare soil on the top of the Koniambo massif (altitude 851 m asl.) was used to test the ability of *A. spirorbis* to act as a nurse plant.

## Materials and methods

### Study site and experimental design

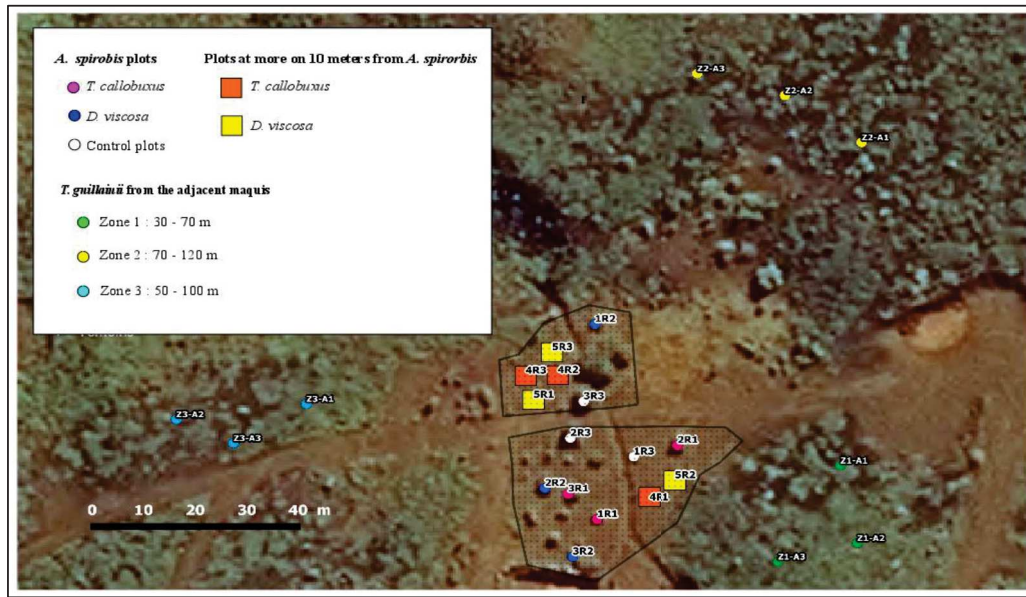
The Koniambo massif, located near the city of Koné in New Caledonia, is currently a nickel mine exploited by the company Koniambo Nickel SAS. The general features of the massif are described in Perrier et al. (2006). The plantation site is a 60 X 30 m rectangle located on the Koniambo massif, between the latitudes S 21° 00' 20-21'' and longitudes E 164° 50' 17-19'' at an altitude of 851 m asl. The site is currently located 300 metres away from the closest exploited mining area. The site is a deposit zone composed of laterites and saprolite blocks developing a nutrient poor and metal rich soil, with high concentrations of iron, chromium, aluminium and nickel. The Ca:Mg ratio of the soil is unbalanced due to excess Mg; the main characteristics of the soil in the study site are listed in ESM Table 1. The climate at the site is altitudinal wet tropical.



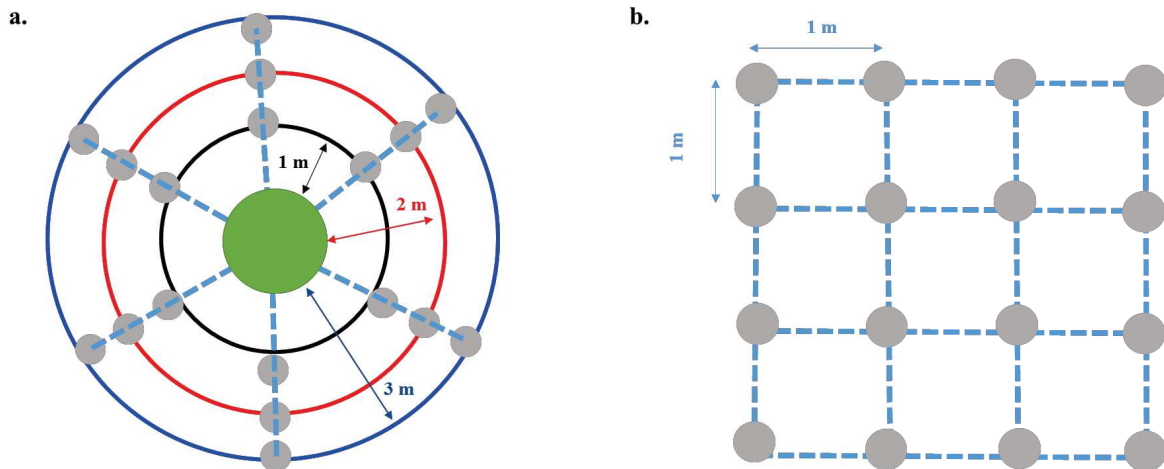
**Table 1:** Average plant growth and survival of *T. callobuxus* and *D. viscosa* according to plantation plots and distance from the *A. spirorbis* canopy.

Tree species	Distance from the nurse plant	Growth/month		% survival
		Plant height	Collar diameter	
		(cm/month)	(mm/month)	
<i>T. callobuxus</i>	Circular plots	1 m	0.22 +/- 0.18	100
		2 m	0.31 +/- 0.28	100
		3 m	0.24 +/- 0.14	100
	Square plots	> 10 m	1.14 +/- 0.62	98.1
<i>D. viscosa</i>	Circular plots	1 m	1.61 +/- 0.52	83.3
		2 m	1.68 +/- 0.28	83.3
		3 m	2.05 +/- 1.13	63.2
	Square plots	> 10 m	2.99 +/- 1.19	56.2

Our experimental plantation was established in May 2015 and contained the remains of a former plantation of *A. spirorbis* dating from 2003, in the form of some scattered 12-year-old trees. The site is surrounded by diversified *maquis* vegetation with the recurring presence of the ECM endemic shrub species *T. guillainii*. It should be noted that this vegetation is a potential source of ECM inoculums for planted *T. callobuxus* saplings. We thus delimited three zones in the *maquis* in which *T. guillainii* was sampled to assess ECM fungal diversity (Figure 1). In each zone, three *T. guillainii* were sampled. The coordinates of the nine trees are listed in ESM Table 2.



**Figure 1:** View of plantation site and surrounding area on the Koniambo massif, New Caledonia. Plantation plots are located inside areas surrounded by black lines. The circles inside planting areas represent plots planted around *A. spirorbis* (Figure 2a). The squares represent plots at least 10 m away from *A. spirorbis* (Figure 2b). The circles outside planting areas are the exact positioning of harvested *T. guillainii* trees in the natural maquis surrounding the planting areas.



**Figure 2:** Diagrams of the two types of plot ; **a:** Using *A. spirorbis*. The green circle represents the extent of the *A. spirorbis* canopy at the centre of the circular plot. The grey circles represent the target species planted on radiiuses at 3 different distances from the *A. spirorbis* tree. The black line represents the radius at a distance of 1 m from the limit of the *A. spirorbis* canopy planted with 6 target species; the red line represents the 2 meter radius and the blue 3 metres; **b:** Plot of bare soil located at least 10 metres from the closest *A. spirorbis*. The target species are represented by grey circles and comprise 4 X 4 plants spaced 1 metre from each other.

Two target species, *T. callobuxus* and *D. viscosa* were selected to test the ability of *A. spirorbis* to act as a nurse plant. The first one *T. callobuxus* is ECM enabling, and was used to test the ability of the nurse species to provide appropriate ECM fungal partners and putatively to promote the growth of our target species. The second species, *D. viscosa*, forms AM and is not ECM, thus enabling us to test the ability of the nurse plant to promote growth of the target plant in the absence of ECM facilitation effects; it should be noted that all three species, (*A. spirorbis*, *T. callobus* and *T. guillainii*) are able to form arbuscular mycorrhizas and hence to benefit from the previously established AM network. In these conditions, two types of plots were planted: one in the close vicinity of the 12-years-old *A. spirorbis* and the second out of the vicinity of *A. spirorbis*. The first type of plantation was a circle with an *A. spirorbis* at the centre; three trees were planted on each radius, the first one metre, the second 2 m and the third 3 m from the limit of the *A. spirorbis* canopy with *T. callobuxus* and *D. viscosa* and three repetitions per target species (i.e. a total of 54 plants of each target species); three *A. spirorbis* were not planted and used as controls. The second type of plot was a standard 4 row/4 line plantation with 1 m space between the lines and the rows; 3 plots were planted with *T. callobuxus* and 3 plots with *D. viscosa* (i.e. a total of 48 plants of each target species).

Figure 1 and Figure 2 show the layout of the experimental plots

### **Monitoring plant growth**

*Tristaniopsis callobuxus* and *D. viscosa* survival, collar diameter and height were measured quarterly after transplantation in May 2015 until July 2016. The goal was to check whether *A. spirorbis* had an effect on the survival and/or growth of the target species.

### **Sampling ectomycorrhizal root tips**

In order to describe the original ECM fungal communities at planting time: May 2015, 15 ECM root tips were sampled per plant for DNA analysis on three *T. callobuxus* saplings randomly selected in each plot (for a total of  $3 \times 6 \times 15 = 270$  root tips). Using the root tracking method described in (Perrier et al. 2006), 15 root tips

from the nine *A. spirorbis* used as nurse plant and nine *T. guillainii* from the surrounding maquis (Figure 1) were harvested (total of  $15 \times (9 + 9) = 270$  root tips).

To describe ECM fungal communities after a growth period of 13 months (July 2016), three randomly chosen *T. callobuxus* per plot were uprooted and 15 root tips were harvested per plant (total of  $3 \times 6 \times 15 = 270$  root tips).

A root tip was considered ECM when a fungal mantle surrounded it. The root tips were preserved in 2% cetyltrimethylammoniumbromide (CTAB), 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA) at -20°C until molecular analysis.

### **Molecular analyses**

Using Sanger sequencing, each root tip was subjected to molecular analyses to characterise the ECM fungus putatively involved in the ECM symbiosis. For this purpose, total DNA was extracted from each ECM root tip using the Wizard Genomic DNA Purification (Promega, Charbonnière-les-Bains, France) following the protocol described by (Carriconde et al., 2008). A fragment of approximately 650 bp ribosomal DNA from the internal transcribed spacer regions (ITS) was amplified using primers ITS1F (5'-TTTCCGTAGGTGAACCT-3'; Gardes and Bruns 1993) and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'; White et al. 1990). The PCR reaction used for this amplification was prepared in a total volume of 25 µL containing a 1 µL aliquot of genomic DNA diluted 1/20, 1 µM of each primer, 1.5 units of Taq DNA polymerase (Promega, Charbonnières, France), 5 µL of 5X Promega Taq polymerase buffer, 2 mM of MgCl<sub>2</sub> and 200 µM of dNTP Promega. Amplification was performed with a Mastercycler ® thermocycler Eppendorf (Eppendorf, Hamburg, Germany) programmed as follows: one cycle of 3 min at 94°C, followed by 35 cycles of 45 s at 94°C, 45 s at 55°C, 1 min at 72°C and a final extension of 10 min at 72°C. PCR products were checked by electrophoresis on a 1% agarose gel (Sigma) in 0.5% TBE buffer with 2 µL ethidium bromide (BET, 10 µg/mL for 100 mL gel). A size marker 1,000 pb (Promega) was used to estimate the weight of the different fragments. The DNA bands were then visualised by fluorescence under UV light and photographed. Samples with simple well-

defined bands were then sequenced with primers ITS4 and ITS1 by the Genoscreen Company (Genoscreen, Lille, France) using genetic analysis based on capillary electrophoresis ABI3730XL.

The molecular data were analysed as follows: the ITS1 and ITS4 sequences were analysed and assembled into contigs with Geneious® 7.1.9 software (Biomatters Ltd.). The total DNA sequences were assigned to operational taxonomic units (OTU) using a sequence identity cut off of 97% of the ITS sequences, as reported in Smith et al. (2013) using the software CD-Hit Est® (Li and Godzik 2006). The fungal phylogenetic lineages were assigned using the BLASTn algorithm and then identified using the NCBI database according to the fungal nomenclature reported by Tedersoo et al. (2010).

### **Data analysis**

Statistical analyses were performed in the R environment (R Development Core Team 2011). To test the sampling method, the observed and estimated sample completeness curves for each plot were constructed using the iNEXT online software (<http://chao.stat.nthu.edu.tw>; Chao et al. 2016).

The Shannon  $H'$  and Simpson  $D$  indexes were used to evaluate plot diversity (Zack and Willig 2004). In addition, the estimated and asymptotic richness index  $^{\circ}D$ , which counts species equally without considering their relative abundance, the Shannon diversity index  $^1D$ , which counts species in proportion to their abundance, and the Simpson diversity index  $^2D$ , which discounts all but the dominant species in the assemblage, were calculated using the iNEXT R package (Hsieh et al. 2016).

The total species richness of each community was estimated using Specpool in the Vegan package (Oksanen et al. 2013) with the first-order jackknife estimator (Smith and Van Belle 1984) because OTUs observed at least twice are no longer considered rare.

The different distributions of ECM fungal lineages richness associated with the 3 ECM tree species at planting and 13 months after planting were compared two-by-two with a chi-square independence test calculated with the “chisq.test” function in the R Stats package (Agresti, 2007).

The results in bold indicate that the null hypothesis: “no significant difference between the two distributions is not rejected at 5% risk”. To reinforce this analysis, the dissimilarity Jaccard index was calculated with the *vegdist* function (Oksanen et al. 2013) in the R *Vegan* package (Chao et al., 2004). The Jaccard index between each community was represented by principal coordinate analysis (PCoA) in the “ape” package (Paradis et al. 2004).

## Results

### *Tree survival and growth*

Tree survival and average growth rates 13 months after field transplantation are listed in Table 1. Thirteen months after transplantation of *T. callobuxus* saplings in the field, the survival rate was 98% in the square plots located at least 10 m away from *A. spirorbis* and 100% in the circular plots in the close vicinity (1 up to 3 m) of *A. spirorbis*. In the square plots, average height and collar diameter were respectively  $1.14 \pm 0.62$  cm/month and  $0.22 \pm 0.09$  mm/month, and in the circular plots  $0.48 \pm 0.30$  cm/month and  $0.11 \pm 0.03$  mm/month. These very low growth rates with high variability between individuals produced a set of data which do not make it possible to demonstrate any difference or absence of difference between the treatments in the case of *T. callobuxus*. In the case of *D. viscosa*, survival was lower (56.2 %) in the square plots compared to that (83%) of the saplings planted 1 and 2 m away from the limit of the *A. spirorbis* canopy in the circular plots. Like for *T. callobuxus*, the data set failed to reveal any significant difference or lack of difference between treatments in the case of *D. viscosa*.

### *Diversity of ECM fungal communities associated with the different ECM tree species*

Out of a total of 810 root tips, 312 ECM sequences were obtained. These sequences were merged into 97 ECM OTUs which were grouped into 15 fungal lineages. One representative sequence of each OTU was deposited in DNA Data Bank of Japan (DDJB) from the accession numbers LC271284 to LC271380.

Sample completeness curves (ESM Figure 1a) indicate that the sampling effort was just sufficient to continue our interpretation of the experimental results. We can thus assume we have provided evidence for more than 75% of ECM fungal diversity associated with *A. spirorbis*, more than 50% for *T. guillainii* from the surrounding maquis vegetation and more than 85% for *T. callobuxus* at the end of the nursery stage and 13 months after transplanting.

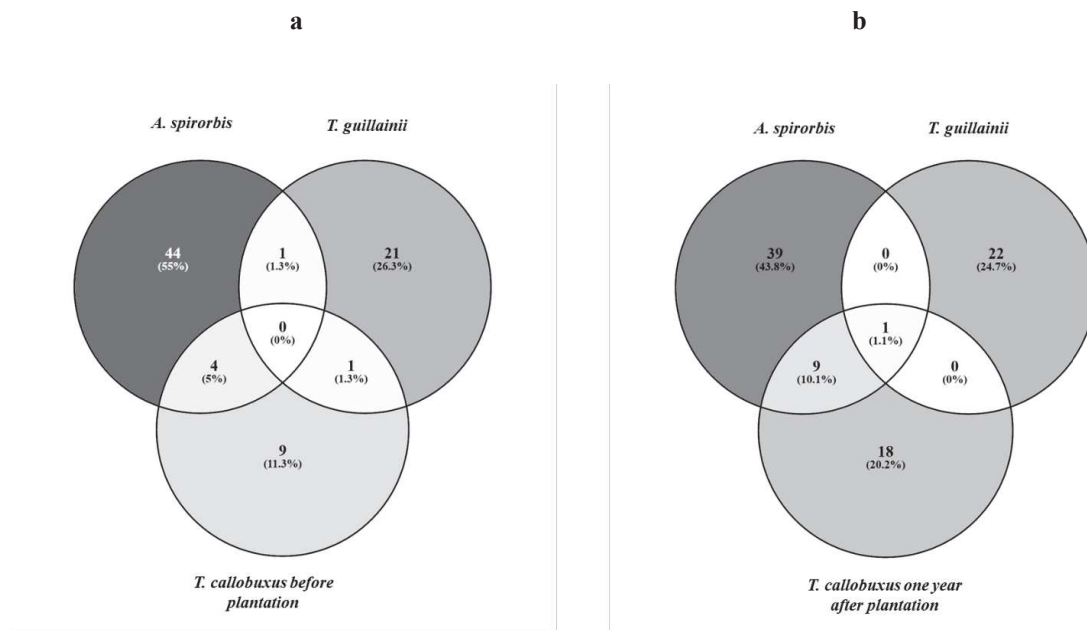
With the coverage-based rarefaction and extrapolation sampling curves (ESM Figure 1b), we can assume we provide evidence for more than 45% of ECM OTUs associated with *A. spirorbis* at the study site, more than 25% for *T. guillainii* from the surrounding maquis vegetation, more than 25% of ECM OTUs associated with *T. callobuxus* at the end of the nursery stage and more than 75% 13 months after transplanting. These results show that the sampling effort was sufficient to provide evidence that most ECM diversity associated with *T. callobuxus* 13 months after transplanting was evidenced (Table 2).

**Table 2:** Observed and estimated asymptotic indexes of diversity of the distribution of OTUs according to the host tree species based on “iNext” algorithm R Package as reported by Hsieh et al. (2016).

	Richness <sup>0</sup> D		Shannon <sup>1</sup> D		Simpson <sup>2</sup> D	
	Observed	Estimated	Observed	Estimated	Observed	Estimated
TC T0	14	<b>46 ± 39.0</b>	1.833	<b>2.11 ± 0.237</b>	0.754	<b>0.77 ± 0.038</b>
TC TF	28	<b>37 ± 6.7</b>	3.011	<b>3.28 ± 0.130</b>	0.936	<b>0.95 ± 0.010</b>
AS	49	<b>109 ± 31.0</b>	3.261	<b>3.67 ± 0.156</b>	0.933	<b>0.94 ± 0.011</b>
TG	23	<b>93 ± 61.0</b>	2.971	<b>3.99 ± 0.383</b>	0.939	<b>0.97 ± 0.017</b>

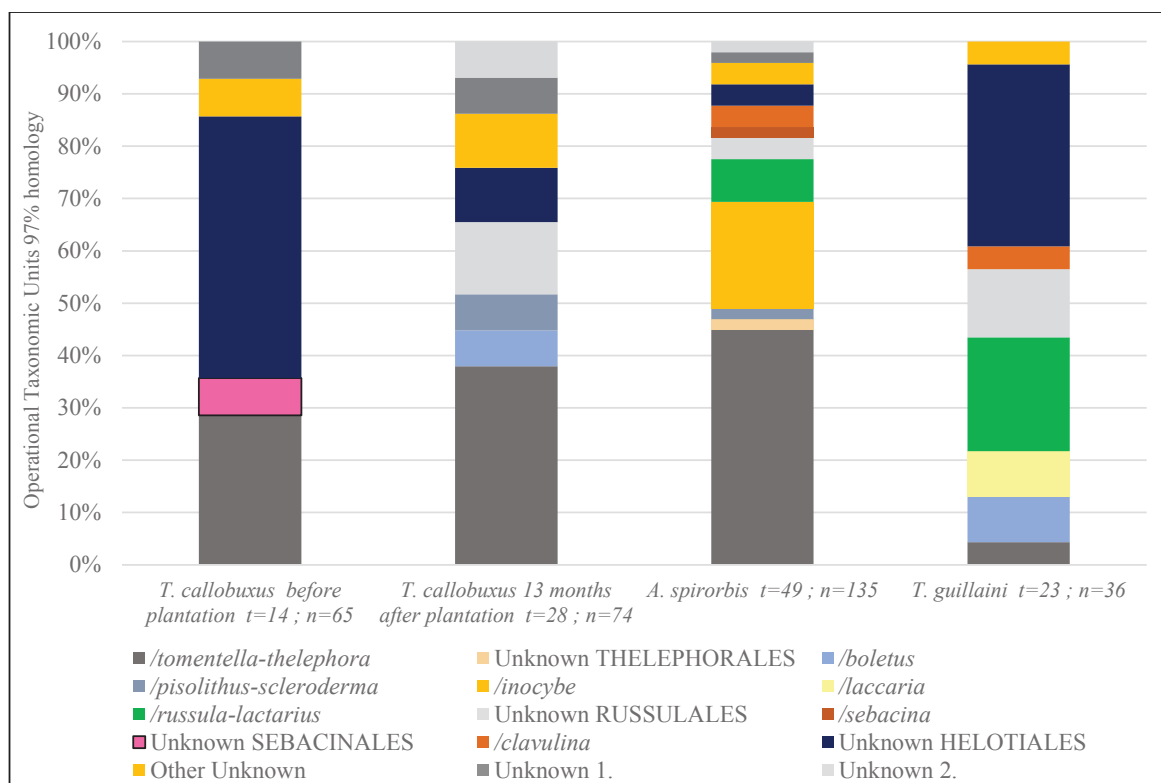
TC T0: *T. callobuxus* before transplantation; TC TF: *T. callobuxus* 13 months after transplantation; AS: *A. spirorbis*; TG: *T. guillainii*

At transplantation, we observed 49 OTUs grouped in 12 lineages on *A. spirorbis*, 23 OTUs grouped in 7 lineages on *T. guillainii* and 14 OTUs grouped in 5 lineages on *T. callobuxus* saplings. Thirteen months after transplanting, the number of OTUs associated with *T. callobuxus* was 28 i.e. it doubled, and the number of OTUs shared with *A. spirorbis* increased from 4 to 9 (Table 2 ; Figure 3, 4)



**Figure 3:** Venn diagram showing shared ECM fungal OTUs (97% homology) between 12-year-old *A. spirorbis*, *T. guillainii* from adjacent natural adjacent formations and *T. callobuxus* sapling; **a:** at transplantation (end of the nursery stage); **b:** 13 months after plantation in the vicinity of *A. spirorbis* as ECM nurse plant.





**Figure 4:** Taxonomic distribution of ECM fungi associated with *T. callobuxus* before transplantation and 13 months after transplantation; in the vicinity of 12-year-old *A. spirorbis*; *T. guillainii* from adjacent natural maquis formations. The species richness estimated using the Jackknife index (t) and the numbers of sequences obtained (n) are given for each community.

Concerning lineages, we observed 4 new lineages on the *T. callobuxus* 13 months after transplantation: */boletus*, */pisolithus-scleroderma*, */russulales* and an */unknown* lineage. Except */boletus*, which was present only on *T. guillainii* all other lineages were observed on *A. spirorbis* ECM (Figure 4).

### Comparison of fungal communities

The chi-square Pearson tests (Table 3 a, b) showed that the distributions of ECM fungi lineages differed between the different tree species, except for *T. callobuxus* at the end of the nursery stage and 13 months after transplanting, the latter being close to the nurse plant *A. spirorbis* (Table 3a). Taxonomic distribution differed between species and also between *T. callobuxus* after the nursery stage or 13 months after transplanting (Table 3b).

**Table 3:** Chi-square Pearson test for the pairwise comparison of *p* value of *T. callobuxus* before and 13 months after transplantation and of *A. spirorbis*; **a:** for the distribution of ectomycorrhizal fungi lineages; **b:** for the taxonomic distribution of ECM OTUs. Results in bold indicate that the null hypothesis is not rejected at 5% significance level.

<b>a</b>			
	TC T0	TC TF	AS
TC TF	<b>0.1014</b>	-	-
AS	0.0337	0.0322	-
TG	0.00337	0.0019	5.226e <sup>-05</sup>

<b>b</b>			
	TC T0	TC TF	AS
TC TF	3.339e <sup>-08</sup>	-	-
AS	4.026e <sup>-12</sup>	5.791e <sup>-09</sup>	-
TG	6.18e <sup>-08</sup>	1.536e <sup>-06</sup>	6.802e <sup>-10</sup>

TC T0: *T. callobuxus* before transplantation; TC TF: *T. callobuxus* 13 months after transplantation; AS: *A. spirorbis*; TG: *T. guillainii*

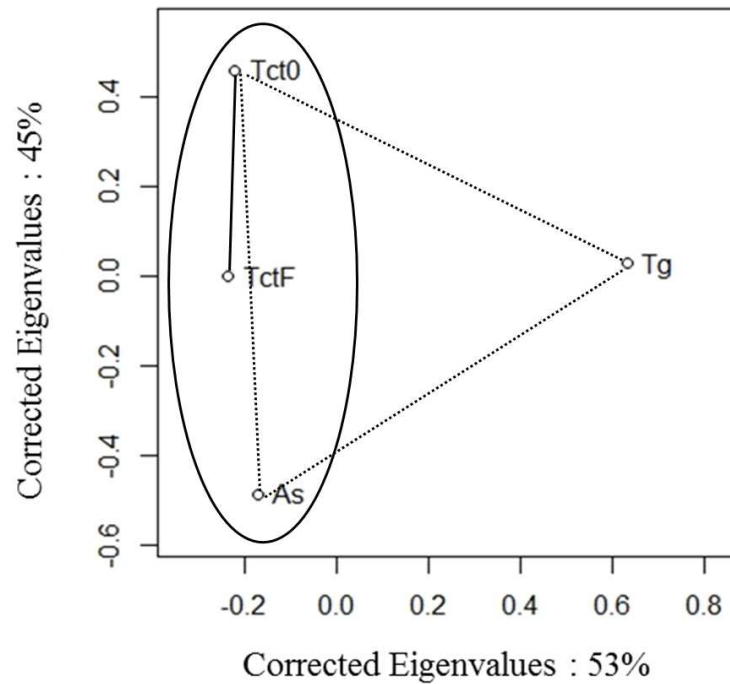
The Jaccard dissimilarity indexes (Table 4) showed that the taxonomic distributions of ECM fungi associated with *T. guillainii* differed most when compared with all the other trees; the maximum of 1.00 was observed between *T. guillainii* and *T. callobuxus* at the end of the nursery stage. With values of 0.89 and 0.90, the taxonomic distribution of ECM fungi associated with *A. spirorbis* and *T. callobuxus* 13 months after planting can be considered as close.

**Table 4:** Jaccard dissimilarity indexes for the pairwise comparison of the taxonomic distribution of ECM fungi associated with *T. callobuxus* before and 13 months after transplantation and of *A. spirorbis*. A value of 0 means that non-identical objects may be regarded as similar; a value close to 1 indicates that the objects are different. Jaccard index is computed as  $2B/(1+B)$ , where B is the Bray-Curtis dissimilarity index.

	TC T0	TC TF	AS
TC TF	0.8992248	-	-
AS	0.9473684	0.9015544	-
TG	1.0000000	0.9909910	0.9940828

TC T0: *T. callobuxus* before transplantation; TC TF: *T. callobuxus* 13 months after transplantation; AS: *A. spirorbis*; TG: *T. guillainii*

Principal coordinates analysis (PCoA) based on Jaccard distances between the different taxonomic distribution of ECM fungi (Figure 5) revealed convergences at the level of ECM fungal communities associated with *A. spirorbis* and *T. callobuxus* at the end of the nursery stage and 13 months after transplanting,



**Figure 5:** PCoA representing relative distance between fungal communities following two main axes. The dot plots represent communities of ECM fungal taxa. Within the plots; the distance between 2015 (before transplanting) and 2016 (13 months after planting) *T. callobuxus* ECM fungal communities are represented by solid lines, and the distance between the different tree ECM fungal communities by dotted lines. The circle groups the most similar communities.

TC T0: *T. callobuxus* before transplantation; TC TF: *T. callobuxus* 13 months after plantation; AS: *A. spirorbis*; TG: *T. guillainii*

## Discussion

### *Diversity of ECM fungal communities present on the plantation site*

In terms of diversity, our results are consistent with those of Waseem et al. (2017) who also recorded 7 lineages associated with *T. guillainii* on the Koniambo massif. There were some differences in lineage compositions, notably, the absence in our samples of any taxon (OTU) affiliated with */cortinarius*. Indeed, Waseem et al. (2017) collected samples in a shrubby ecosystem developed on slope in gravel ferrallitic soil 120 m lower in altitude than our site located 700 m further in distance from our site, on the top of the Koniambo massif where

soil is a lateritic cuirace and vegetation scarce. In New Caledonia, Houlès et al. (submitted) observed on 60 *A. spirorbis* distributed over 12 different sites grouped in 3 major soil types 76 OTUs grouped into 15 lineages. In ferrallitic soils, Houlès et al. (submitted) observed 12 lineages associated with *A. spirorbis*, which is in perfect agreement with our own results. In two sites located at the base of the Koniambo massif, Houlès et al. (submitted) observed respectively 7 and 13 OTUs associated with *A. spirorbis*. The diversity observed at the base of the Koniambo massif seems lower than that on top of the Koniambo massif, i.e. 840 m higher in altitude and 6,500 m further in distance from our site. This difference is probably due to environmental factors such as soil composition and structure, altitude, climate, vicinity of a diversity of other ECM species, etc.

In an old-growth mixed conifer forest monitored over a 3-year period, Izzo et al. (2002) conclude that spatial variations in ECM fungal communities compositions are greater than temporal variations. Studying a native forest dominated by *Asteropeia mcphersonii* in Madagascar also developed on ferrallitic soil, Henry et al. (2015) come to the same conclusion: temporal variations in ECM fungal composition are negligible compared to spatial variations. Taking this into account, we can assume that 13 months is a too short period to observe any significant temporal variations in the composition of the ECM fungal community, which is in agreements with our observations for *A. spirorbis* and *T. guillainii*. By contrast, temporal variations may be significant in nursery saplings after their transfer to the field.

#### ***Changes in the ECM fungal community associated with T. callobuxus***

Nursery conditions, i.e. confined space, high soil fertility and abundant watering, significantly influence mycorrhizal interactions (El Karkouri et al. 2005; Trocha et al. 2006; Fernández et al. 2013), may select for opportunistic ECM species and contribute to low ECM fungal diversity (Schmidt et al. 2017). Because the nursery conditions differ markedly from those in the plantation site, the composition of the ECM fungal communities associated with the saplings may be significantly influenced after transplantation. Indeed, the spontaneous ECM communities of nursery saplings usually differ from those associated with plants growing in natural environments (El Karkouri et al. 2005; Trocha et al. 2006; Fernández et al. 2013). The field conditions may select for typical forest ECM species and may eliminate or at least reduce populations of

opportunistic fungi (Hilszczanska and Sierota 2006). In the absence of any inoculation practices, we can assume that, at the end of the nursery stage, the *T. callobuxus* ECM fungal community was mainly composed of ruderal species, which are easily dispersed by spores (Peay et al. 2007; Tedersoo et al. 2009) and mostly adapted to survive nursery conditions. The three dominating lineages are: Unknown Sebaciales, Unknown Thelephorales and Unknown Helotiales, which are often found under ruderal conditions.

Transplanting from the nursery to the natural environment has already been studied notably on plants inoculated with selected ECM fungal strains (e.g. Selosse et al. 1998; Duponnois et al. 2008; Dalong et al. 2011). Competition between inoculated strains and native ECM fungi in these conditions is also well documented. However, temporal variations in ECM fungal community composition after plantation, in particular the replacement of “nursery ECM fungi” by “forest ECM fungi” are poorly documented (Hilszczanska and Sierota 2006). The ability of *Salix reinii* seedling to connect to an already established common ECM network has already been reported (Nara 2006) under controlled nursery conditions. In our observation, thirteen months after transplantation, the number of OTUs associated with *T. callobuxus* doubled and the number of OTUs shared with *A. spirorbis* increased from 4 to 10. These numbers also suggest marked changes in lineages. We observed the disappearance or marked decrease in two ruderal lineages: Unknown Sebaciales and Unknown Helotiales; at the same time in *T. callobuxus* roots, we observed the appearance of new lineages shared with *A. spirorbis* such as */boletus*, */scleroderma-pisolithus* and Unknown Russulales. These changes in the ECM fungal community associated with *T. callobuxus* suggest that 13 months after transplantation, *T. callobuxus* was connected to the common ECM network previously established by *A. spirorbis*. The decrease in the number of nursery OTUs was probably due to their maladjustment to site conditions.

#### ***Acacia spirorbis: a tool for the ecological restoration of mine site in extreme edaphic conditions***

In the majority of the cases, ectomycorrhizal networks are known to benefit associated seedlings, however, the effects of these networks depend on the identity of the seedling species, mycorrhizal identity, plant species combinations and study system (Van Der Heijden and Horton 2009). *Acacia spirorbis* is a triple symbiotic

species able to form arbuscular mycorrhizas, ectomycorrhizas and, like most Mimosoids, nitrogen fixing nodules with rhizobia (Ducousso et al. 2014). Thus there are many possible ways to successfully use *A. spirorbis* as nurse plant for the ecological restoration of mine sites which merit further exploration. Taking into account our results from this field experiment and our experience in ecological restoration in extreme New Caledonian soils, we recommend as the first step, planting *A. spirorbis* with 1 m by 1 m spacing. At this density, (10,000 trees per hectare), the canopy will rapidly close, litter will begin to accumulate and a new mycorrhizal network will establish itself. Between 3 and 5 years after planting, thinning should be carried out to leave *A. spirorbis* with 10 m by 10 m spacing. Within one and five metres from the remaining *A. spirorbis*, a range of endemic species forming or not arbuscular mycorrhizas should be planted. Beyond the direct influence of the remaining *A. spirorbis*, it would be better to plant endemic ECM species such as *Tristaniopsis* spp., *Sannantha* spp. or *Melaleuca* spp. which could benefit from the established ECM network.

## Acknowledgements

The authors wish to thank the projects ANR- 12-ADAP-0017 ADASPIR and GIP Nickel and its Environment GIPCNRT98 BIOINDIC for funding, *Plate Forme du Vivant IRD Nouméa* for access to their laboratory and IAC for supply *T. callobuxus* saplings. This work was conducted as part of a PhD supported by KNS in the framework of a CIFRE agreement (CIFRE 2013/1434).

## References

- Agresti A. 2007. An introduction to categorical data analysis, 2<sup>nd</sup> ed., Hoboken NJ: Wiley-Interscience.
- Alexander I, Selosse M-A. 2009. Mycorrhizas in tropical forests: a neglected research imperative. *New Phytol* 182: 14–16.
- Amir H, Ducousso M. 2010. Les bactéries et les champignons du sol sur roche ultramafiques. In: **L'Huillier L., Jaffré T., Wulff A. (eds)**. Mines et environnement en Nouvelle-Calédonie : les milieux sur substrats ultramafiques et leur restauration. Editions **IAC, Nouméa, Nouvelle-Calédonie**, p 129-145.
- Carriconde F, Gryta H, Jargeat P, Mouhamadou B, Gardes M. 2008. High sexual reproduction and limited contemporary dispersal in the ectomycorrhizal fungus *Tricholoma scalpturatum*: new insights from population genetics and spatial autocorrelation analysis. *Mol Ecol* 17:4433-4445.
- Chao A, Chazdon RL, Colwell RK, Shen T-J, 2004. A new statistical approach for assessing similarity of species composition with incidence and abundance data. *Ecol Lett* 8: 148–159.
- Chao A, Chiu CH, Jost L. 2016. Statistical challenges of evaluating diversity patterns across environmental gradients in mega-diverse communities. *J Veg Sci* 27:434-438.
- Cherrier J.F. 1990. Le reverdissement des terrains miniers en Nouvelle Calédonie. *Bois For Trop* 225:5-23.
- Dalong M, Luhe W, Guoting Y, Liqiang M, Chun L. 2011. Growth response of *Pinus densiflora* seedlings inoculated with three indigenous ectomycorrhizal fungi in combination. *Braz J Microbiol* 42(3):1197-1204.
- Diédhiou AG, Selosse M-A, Galiana A, Diabaté M, Dreyfus B, Bâ AM, De Faria SM, Béna G. 2010. Multi-host ectomycorrhizal fungi are predominant in a Guinean tropical rainforest and shared between canopy trees and seedlings. *Environ Microbiol* 12: 2219–2232.
- Ducousso M, Bourgeois C, Buyck B, Eyssartier G, Vincelette M, Rabevohitra R, Béna G, Randrihasipara L, Dreyfus B, Prin Y. 2004. The last common ancestor of Sarcolaenaceae and Asian dipterocarp trees was ectomycorrhizal before the India-Madagascar separation, about 88 million years ago. *Mol Ecol* 13: 231-236.



- Ducousso M, Galiana A, Prin Y, Hannibal L, Jourand P, Klonowska A, Carriconde F, Lebrun M, Fritsch E, Julliot F, Amir H. 2014. *Acacia spirorbis* a model plant to study the contribution of symbiotic root microorganisms in plant adaptation to soil constraints: news and prospects. In: Sustaining the Future of *Acacia* Plantation Forestry, Hue, Vietnam.
- Ducousso M, Ramanankierana H, Duponnois R, Rabévoitra R, Randrihasipara L, Vincelette M, Dreyfus B, Prin Y. 2008. Mycorrhizal status of native trees and shrubs from eastern Madagascar littoral forests with special emphasis on one new ectomycorrhizal endemic family, the Asteropeiaceae. *New Phytol* 178: 233–238.
- Duponnois R, Kisa M, Prin Y, Ducousso M, Plenchette C, Lepage M, Galiana A. 2008. Soil factors influencing the growth response of *Acacia holosericea* A. Cunn. ex G. Don to ectomycorrhizal inoculation. *New Forests* 35:105–117.
- El Karkouri K, Martin F, Emmanuel Douzery JP, Mousain D. 2005. Diversity of ectomycorrhizal fungi naturally established on containerised *Pinus* seedlings in nursery conditions. *Microbiol Res* 160: 47–52.
- El Karkouri K, Martin F, Mousain D. 2002. Dominance of the mycorrhizal fungus *Rhizopogon rubescens* in a plantation of *Pinus pinea* seedlings inoculated with *Suillus collinitus*. *Ann For Sci* 59: 197–204.
- Fernández NV, Marchelli P, Fontenla SB. 2013. Ectomycorrhizas naturally established in *Nothofagus nervosa* seedlings under different cultivation practices in a forest nursery. *Microb Ecol* 66: 581– 592.
- Gardes M, Bruns TD. 1993. ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes. Application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol* 2:113–118.
- Henry C, Raivoarisoa J-F, Razafimamonjy A, Ramanankierana H, Andrianaivomahefa P, Selosse MA, Ducousso M. (2015) *Asteropeia mcphersonii*, a potential mycorrhizal facilitator for ecological restoration in Madagascar wet tropical rainforests. *For Ecol Manage* 358:202–211.
- Henry C, Raivoarisoa JF, Razafimamonjy A, Ramanankierana H, Andrianaivomahefa P, Ducousso M, Selosse MA. 2017. Transfer to forest nurseries significantly affects mycorrhizal community composition of *Asteropeia mcphersonii* wildlings. *Mycorrhiza* DOI: 10.1007/s00572-016-0750-z

- Hilszczanska D, Sierota Z. 2006. Persistence of ectomycorrhizas by *Thelephora terrestris* on outplanted Scots pine seedlings. *Acta Mycologia* 41(2):313-318.
- Hsieh TC, Ma KH, Chao A. 2016. iNEXT: an R package for rarefaction and extrapolation of species diversity (Hill numbers). *Method Ecol Evol* DOI: 10.1111/2041-210X.12613.
- Isnard S, L’huillier, L Rigault F, Jaffré T. 2016. How did the ferralitic soils shape the flora of the New Caledonian hotspot? *Plant Soil* 403:53-76.
- Izzo A, Agbowo J, Bruns TD. 2002. Detection of plot-level changes in ectomycorrhizal communities across years in an old-growth mixed-conifer. *New Phytol* 166: 619–630.
- Jaffré T., Rigault F., Sarrailh J.M. 1994. La végétalisation des anciens sites miniers. *Bois For Trop* 242:45-57.
- Kazantseva O, Bingham M, Simard SW, Berch SM. 2009. Effects of growth medium, nutrients, water, and aeration on mycorrhization and biomass allocation of greenhouse-grown interior Douglas-fir seedlings. *Mycorrhiza* 20: 51–66.
- L’Huillier L, Jaffré T, Wulff A. 2010. Mines et Environnement en Nouvelle-Calédonie : les Milieux sur Substrats Ultramafiques et Leur Restauration. Noumea, New Caledonia: Editions IAC.
- Li W, Godzik A. 2006. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics* 22:1658-1659.
- McCoy S, Jaffre T, Rigault F, Ash JE. 1999. Fire and succession in the ultramafic maquis of New Caledonia. *J Biogeography* 26(3):579-594.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Da Fonseca GAB, Kent J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403:853-858.
- Nara K. 2006. Ectomycorrhizal networks and seedling establishment during early primary succession. *New Phytol* 169: 169–178. doi:10.1111/j.1469-8137.2005.01545.x
- Nara K, Hogetsu T. 2004. Ectomycorrhizal fungi on established shrubs facilitate subsequent seedling establishment of successional plant species. *Ecology* 85: 1700–1707.

- Oksanen J, Blanchet G, Kindt R, Legendre P, Minchin P, O'Hara R, Simpson G, Solymos P, Henry M, Wagner H. 2013. Vegan: Community Ecology Package. R package version 2.0-7. <http://CRAN.Rproject.org/package=vegan>
- Paradis E, Claude J, Strimmer K. 2004. APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics* 20: 289–290.
- Peay KG, Schubert MG, Nguyen NH, Bruns TD. 2012. Measuring ectomycorrhizal fungal dispersal: macroecological patterns driven by microscopic propagules. *Mol Ecol* 21(16):4122–4136. doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05666.x.
- Perrier N, Amir H, Colin F. 2006. Occurrence of mycorrhizal symbioses in the metal-rich lateritic soils of the Koniambo Massif, New Caledonia. *Mycorrhiza* 16:449–458.
- R Development Core Team. 2011. "R: A Language and Environment for Statistical Computing". R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>
- Richard F, Millot S, Gardes M, Selosse M-A. 2005. Diversity and specificity of ectomycorrhizal fungi retrieved from an old-growth Mediterranean forest dominated by *Quercus ilex*. *New Phytol* 166: 1011–1023.
- Ryberg M, Larsson E, Molau U. 2009. Ectomycorrhizal Diversity on *Dryas octopetala* and *Salix reticulata* in an Alpine Cliff Ecosystem. *Arct, Antarct Alp Res* 41: 506–514.
- Schmidt DJE, Pouyat R, Szlavecz K, Setälä H, Kotze DJ, Yesilonis I, Cilliers S, Hornung E, Dombos M, Yarwood SA. 2017. Urbanization erodes ectomycorrhizal fungal diversity and may cause microbial communities to converge. *Nature Ecol Evol* 1: 0123. doi:10.1038/s41559-017-0123
- Selosse M-A, Jacquot D, Bouchard D, Martin F, Le Tacon F. 1998. Temporal persistence and spatial distribution of an American inoculant strain of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* in a French forest plantation. *Mol Ecol* 7: 561–573.
- Smith EP, Van Belle G. 1984. Nonparametric estimation of species richness. *Biometrics* 40: 119–129.

- Smith ME, Henkel TW, Aime MC, Fremier AK, Vilgalys R. 2011. Ectomycorrhizal fungal diversity and community structure on three co-occurring leguminous canopy tree species in a Neotropical rainforest. *New Phytol* 192: 699–712.
- Smith ME, Henkel TW, Uehling JK, Fremier AK, Clarke HD, Vilgalys R. 2013. The ectomycorrhizal fungal community in a neotropical forest dominated by the endemic dipterocarp *Pakaraimaea dipterocarpacea*. *PloS One* 8: e55160.
- Tedersoo L, May TW, Smith ME. 2010. Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza* 20: 217–263.
- Trocha LK, Rudawska M, Leski T, Dabert M. 2006. Genetic diversity of naturally established ectomycorrhizal fungi on Norway spruce seedlings under nursery conditions. *Microb Ecol* 52: 418–425.
- Vaario L-M, Tervonen A, Haukioja K, Haukioja M, Pennanen T, Timonen S. 2009. The effect of nursery substrate and fertilization on the growth and ectomycorrhizal status of containerized and outplanted seedlings of *Picea abies*. *Can J For Res* 39: 64–75.
- Van Der Heijden MGA, Horton TR. 2009. Socialism in soil? The importance of mycorrhizal fungal networks for facilitation in natural ecosystems. *J Ecol* 97: 1139–1150. doi:10.1111/j.1365-2745.2009.01570.x
- Walker LR, del Moral R. 2003. Primary succession and ecosystem rehabilitation. Cambridge University Press.
- Wang B, Qiu YL. 2006. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* 16(5):299-363.
- Waseem M, Ducousso M, Prin Y, Domergue O, Hannibal L, Majorel C, Jourand P, Galiana A. 2017. Ectomycorrhizal fungal diversity associated with endemic *Tristaniaopsis* spp. (Myrtaceae) in ultramafic and volcano-sedimentary soils in New Caledonia. *Mycorrhiza* 27(4):407-413.
- White TJ, Bruns TD, Lee SB, Taylor JW. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, London, UK, pp. 315-322.

- Wulff A, Hollingsworth PM, Ahrends A, Jaffré T, Veillon JM, L'Huillier L, Fogliani B. 2013. Conservation Priorities in a Biodiversity Hotspot: Analysis of Narrow Endemic Plant Species in New Caledonia. *PLoS One* 8(9): e73371.
- Zack JC, Willig MR. 2004. Fungal biodiversity and patterns. In: Mueller GM, Bills GF, Foster MS (eds) *Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods*. Elsevier Academic Press, San Diego, California, USA, pp 59-75.

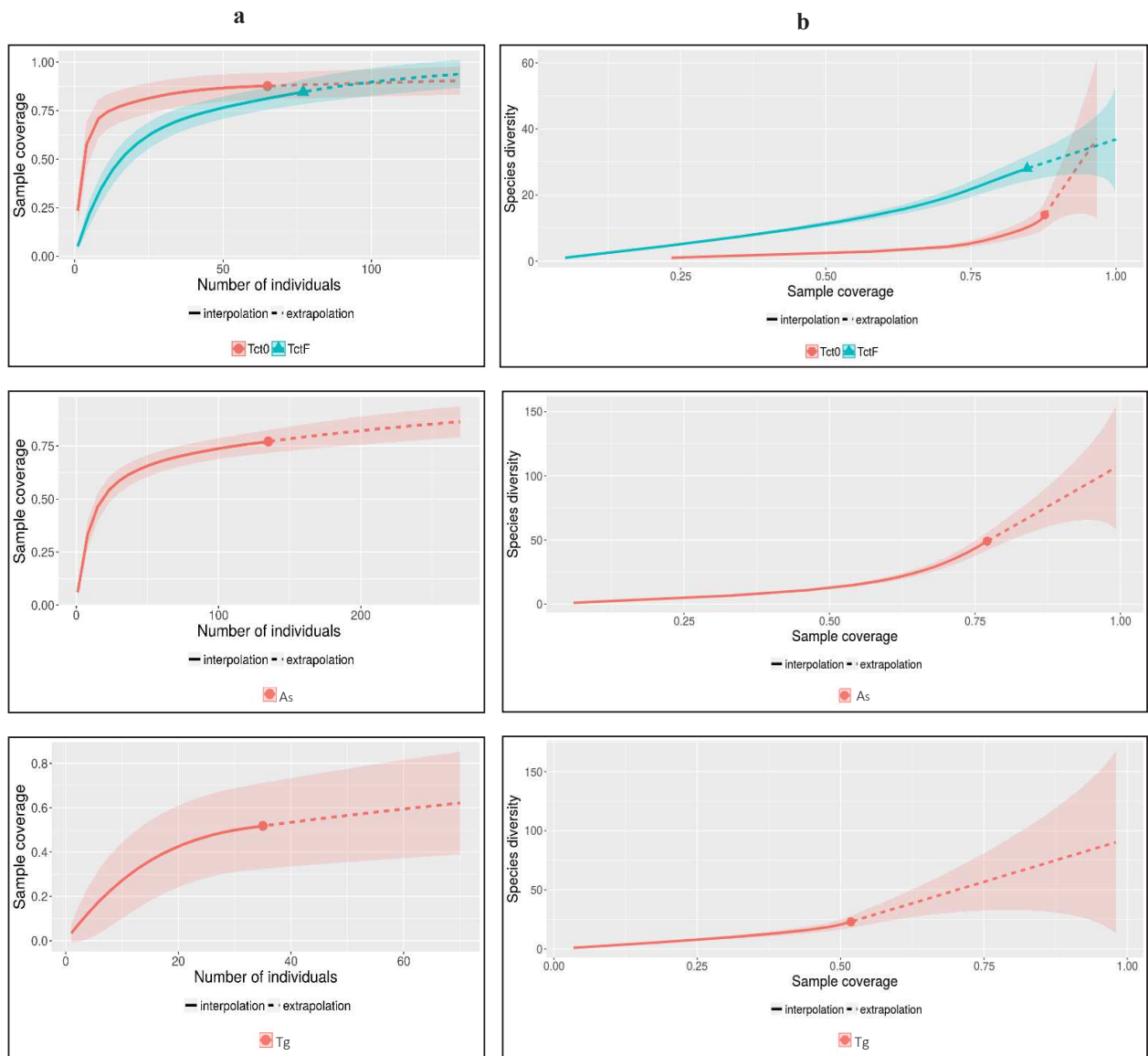
**ESM Table 1:** Chemical characteristics of soil from the plantation site located on the top of the Koniambo massif, New Caledonia.

	Element	Unit	Quantity
Organic matter	Carbon total	%	0.10
	Organic matter	%	1.53
	Organic carbon	%	0.89
	Total nitrogen	‰	0.43
	C/N		20.45
Water content	pF3	%	21.69
	pF4.2	%	15.92
pH-calcimetry	pH (KCl)		6.24
	pH (H <sub>2</sub> O)		6.12
Absorbent complex	Ca	me/100g	0.26
	Mg	me/100g	0.77
	K	me/100g	0.04
	Na	me/100g	0.13
	Al	me/100g	<0.01
	Mn	me/100g	0.04
	H	me/100g	<0.01
	S (Ca, Mg, K, Na)	me/100g	1.23
	CEC	me/100g	1.79
	TS	%	68.28
	pH Co		5.99
Total element	P	mg/kg	674.2
	Fe	mg/kg	595833
	Ni	mg/kg	6612
	Mn	mg/kg	3204
	Cr	mg/kg	20840
	Co	mg/kg	439.3
	Al	mg/kg	31442
	Ca	mg/kg	288.4
	Mg	mg/kg	4583
	Ca/Mg		0.06
	K	mg/kg	159.4
	Na	mg/kg	223.5
	SiO <sub>2</sub>	mg/kg	2.18
Available elements (DTPA)	Fe	mg/kg	1.66
	Cu	mg/kg	0.05
	Zn	mg/kg	0.07
	Mg	mg/kg	4.76
	P	mg/kg	2 < LD (2.2)

**ESM Table 2:** Coordinates of the 9 *T. guillainii* sampled for the characterisation of their associated ECM fungal partners.

Tree reference	Coordinates	Altitude
Z1-A1	21°00'21.19''S; 164°50'20.00''E	853 m
Z1-A2	21°00'21.74''S; 164°50'20.17''E	854 m
Z1-A3	21°00'21.53''S; 164°50'19.63''E	854 m
Z2-A1	21°00'18.79''S; 164°50'20.35''E	847 m
Z2-A2	21°00'18.58''S; 164°50'19.82''E	846 m
Z2-A3	21°00'18.39''S; 164°50'19.61''E	844 m
Z3-A1	21°00'20.71''S; 164°50'16.46''E	848 m
Z3-A2	21°00'20.77''S; 164°50'15.62''E	848 m
Z3-A3	21°00'20.97''S; 164°50'15.98''E	849 m

**ESM Figure 1:** Non-asymptotic approach based on interpolation and extrapolation of species diversity and sample coverage based on the iNEXT online software (<http://chao.stat.nthu.edu.tw>) as reported by (Chao et al. 2016). Solid lines represent rarefaction of the sampling curves, the observed sampling effort. Dotted lines represent extrapolation of the sampling curves, based on Hill numbers for  $q = 0.1$  and 2; **a:** Sample completeness curve according to host tree species; **b:** Coverage-based rarefaction and extrapolation sampling curve according to the host tree species.





## Conclusion générale



Pour son équilibre économique et social la Nouvelle-Calédonie doit faire face à un enjeu environnemental majeur : la préservation de sa biodiversité unique au monde. En effet, ce territoire dispose d'un sous-sol riche, notamment en minerai de nickel dont l'exploitation contribue pour une part importante à son PIB. Toutefois, cette exploitation engendre une empreinte environnementale très forte en termes notamment d'érosion des sols et de réduction de la biodiversité. Pour palier ce problème, depuis les années 1970, progressivement, un code de l'environnement a été mis en place afin de contraindre les opérateurs miniers à réduire les effets de cette exploitation par des actions sur l'environnement. C'est dans ce cadre qu'a été inscrit le contrat CIFRE qui m'a permis de réaliser ce travail de thèse.

L'idée principale de cette thèse était de développer des connaissances nouvelles afin de proposer in fine les éléments nécessaires pour la mise en place d'itinéraires techniques pour la restauration écologique des écosystèmes dégradés par l'activité minière. La première tâche a consisté à réaliser une synthèse de nos connaissances du fonctionnement des maquis miniers et des pratiques actuelles de revégétalisation des sites dégradés. Les sols ultramafiques présentent des caractéristiques extrêmes avec notamment l'omniprésence du fer (c.a. 50 %), des concentrations élevées en métaux lourds potentiellement toxiques comme le nickel, le chrome, le manganèse et le cobalt, des teneurs faibles en nutriments (NPK) et en matières organiques et un déséquilibre du rapport Ca/Mg par un fort excès de magnésium. Dans ces conditions extrêmes, seulement deux espèces, *A. spirorbis* et *C. colina* ont montré de bonnes capacités à se développer. Malgré cette aptitude à croître dans ces sols, ces deux espèces forment des peuplements qui ne permettent pas d'amorcer spontanément une succession végétale nécessaire à la durabilité de la revégétalisation de l'écosystème.

Les écosystèmes présents naturellement sur le massif du Koniambo sont diversifiés et pour certains, dominés par des espèces capables de former des ectomycorhizes comme les espèces des genres *Tristaniopsis*, *Sannantha*, *Melaleuca* ou *Nothofagus*. Cette capacité a notamment été remarquée pour

les espèces du genre *Tristaniopsis* qui couvrent la majorité des surfaces qui seront directement impactées par l'activité minière. Ce trait du genre *Tristaniopsis* est partagé avec *A. spirorbis* qui est également capable de former des ectomycorhizes avec une large diversité de champignon. Une analyse *in silico* des séquences ITS des champignons trouvés associés à ces deux espèces a permis de mettre en évidence de nombreuses espèces fongiques capables, a priori de former des ectomycorhizes avec ces deux espèces. Dans le cas précis de la relation symbiotique ectomycorhizienne d'*A. spirorbis* avec *Pisolithus albus*, les travaux de l'équipe du LSTM ont mis en évidence la contribution de ce champignon dans l'adaptation de sa plante hôte, notamment à la toxicité du nickel avec la description d'une pompe à efflux qui permet au champignon de gérer l'excès de nickel présent dans la solution du sol.

Dans une première approche, nous avons développé un dispositif de terrain afin de décrire la diversité des champignons ectomycorhiziens associée spontanément à *A. spirorbis* dans la variété des sols où pousse cette espèce. Cette étude menée sur 12 sites en Nouvelle-Calédonie, sites aux caractéristiques édaphiques très différentes et représentatives des trois grands groupes de sol, à savoir, les sols ferralitiques, les sols calcaires et les sols siliceux a permis de mettre en évidence 76 OTUs de champignons ectomycorhiziens associés à *A. spirorbis*. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence la capacité d'*A. spirorbis* à pousser dans une variété de sols aux caractéristiques très différentes et, dans tout ces types des sols, la capacité de cet *Acacia* à former des ectomycorhizes avec une diversité de champignons. Nous avons également remarqué que la diversité était significativement moindre dans les sols calcaires par rapport aux sols ferralitiques et siliceux. Bien que non significativement différente, la diversité était plus importante dans les sols ferralitiques.

Afin de tester les capacités d'*A. spirorbis* à permettre l'installation d'espèce du genre *Tristaniopsis* sur le terrain, notamment par la mise en place d'un réseau ectomycorhizien commun, plusieurs essais ont été menés, un en pépinière et trois sur le terrain.

En pépinière, nous avons recherché la capacité des topsoils à permettre l'établissement d'ectomycorhizes à partir des propagules qui y sont naturellement présentes. Ainsi, nous avons testés différents topsoils prélevés sous *A. spirorbis*, sous *T. guillainii*, dans une verse de topsoil stocké provenant d'un maquis paraforestier, dans une verse de topsoil stocké provenant d'un maquis ligno-herbacé et dans une verse de stérile minier stocké. Sur ces substrats, des semis de trois espèces ectomycorhiziennes ont été réalisés, ces espèces sont : *A. spirorbis* (indigène), *T. guillainii* (myrtacée endémique) et d'*E. terreticornis* (myrtacée modèle). Les semis de *T. guillainii* ne s'étant développés sur aucun des sols, il a été jugé que la qualité des graines était en cause et ces données n'ont donc pas été prises en compte. Après une phase de croissance en pépinière, nous avons relevé des paramètres de croissances et réalisé une analyse, par une méthode de séquençage massif, de la diversité de la communauté fongique ectomycorhizienne qui s'est développée dans ces différentes conditions. L'objectif de cet essai était d'évaluer le potentiel de différents topsoils spécifiques à une végétation ou une espèce, notamment *A. spirorbis*, en vue de leur utilisation en restauration écologique. De cet essai, nous pouvons conclure ceci : 1- les topsoils améliorent significativement le développement des plants, comparé à un stérile minier et l'origine de ces topsoils a un effet variable sur le développement de ces plants, 2- les topsoils prélevés sous *A. spirorbis* améliorent significativement le développement des plants cibles comparés aux autres topsoils, 3- on observe un transfert de la diversité ectomycorhizienne entre l'espèce originaire du topsoil et la plante se développant sur ce topsoil en pépinière, 4- *Acacia spirorbis* a une capacité à transférer ses ectomycorhizes via le topsoil, supérieure à *T. guillainii*. Ainsi, on peut avancer de cette étude que *A. spirorbis* est un excellent starter pour produire du topsoil performant en vue de son utilisation en restauration écologique.

Sur les trois essais terrain mis en place sur le massif du Koniambo, un a dû être abandonné. Les raisons de cet abandon sont multiples. Tout d'abord, les difficultés d'accès qui n'ont pas permis un suivi des arrosages nécessaires à la survie des plants pendant les périodes sèches. A cela s'est ajouté une erreur du pépiniériste qui a livré des plants de *Xanthostemon aurantiacus* en lieu et place des plants de *T. guillainii* commandés, d'où la nécessité de replanter cet essai après un an. Compte tenu des contraintes

du site pour le suivi de l'essai et la faible disponibilité en plants de *Tristaniopsis*, nous avons décidé d'abandonner cet essai initialement prévu pour tester la capacité d'un sol nu planté d'*A. spirorbis* âgés de 15 ans à permettre l'implantation de l'espèce cible *T. guillainii* ; après avoir préalablement coupé les *Acacia*.

Les deux autres essais terrain ont pu être conduits malgré l'erreur de livraison du pépiniériste, mais l'un d'eux a tout de même dû être replanté après un an, et le dernier a dû attendre plus d'un an et demi une partie de sa plantation, écourtant fortement la durée de suivi de l'expérience dans le temps de ma thèse. Ainsi le premier a été installé sur une plantation de revégétalisation dont il ne restait plus que quelques *A. spirorbis* isolés âgés d'une douzaine d'années. Cet essai avait pour objet principal de tester la distance jusqu'où l'influence d'*A. spirorbis* est encore sensible pour un effet nurse sur une plante cible : *T. callobuxus*. L'effet nurse a été abordé de deux points de vue : sur la survie et la croissance d'une plante cible et sur l'établissement d'une symbiose ectomycorhizienne avec des partenaires diversifiés attestant potentiellement de la connexion des plants au réseau commun de mycorhization mis en place par *A. spirorbis*. De cet essai, nous avons tirés les conclusions suivantes : 1- la proximité immédiate d'*A. spirorbis* améliore significativement la survie et dans une moindre mesure, la croissance de l'une des deux plantes cibles : *D. viscosa* (mycorhizien arbusculaire) et 2- la présence d'*A. spirorbis*, même distant de plus de 10 m, permet aux plants de *T. callobuxus* de former des ectomycorhizes avec des champignons déjà implantés sur le site grâce à la présence d'*A. spirorbis*. Ainsi, nous avons pu proposer deux recommandations techniques pour la conduite future des essais de restauration écologique assistés par le système plante nurse/plante cible avec *A. spirorbis* : 1- l'effet « environnemental » lié à la proximité de la plante nurse reste faible, de l'ordre de 3 m de la canopée et 2- l'effet sur la dynamique de diversification du cortège ectomycorhizien est visible à une distance plus élevée, de l'ordre d'une dizaine de mètres. Dans ces conditions, on peut envisager une plantation initiale d'*A. spirorbis* avec une densité élevée de l'ordre de 3.000 à 10.000 plants/ha qui subiront une première éclaircie pour planter à proximité immédiate des arbres restant, de préférence, des espèces formant des mycorhizes arbusculaires et à une distance plus grande, à l'occasion d'une seconde éclaircie, des espèces formant des

ectomycorhizes, espèces qui seront capables de se connecter au réseau mycorhizien mis en place par *A. spirorbis*.

Enfin, le dernier essai terrain a été mis en place afin de caractériser la dynamique d'implantation et de diversification d'un réseau ectomycorhizien par *A. spirorbis* sur stérile minier amendé ou non par un apport de topsoil et également de voir la capacité de ce réseau à favoriser l'implantation d'une plante cible de la restauration écologique : *T. guillainii*. Pour cela, une plantation de plus d'1 ha a été mise en place avec dans un premier temps *A. spirorbis* et *D. viscosa* ; en effet la plantation d'une espèce « témoin » à mycorhizes arbusculaires a été incluse dans le dispositif afin d'estimer la contribution du réseau ectomycorhizien d'*A. spirorbis* à l'effet « nurse » de cette espèce. Ces deux espèces ont présenté des taux de survie et des croissances initiales tout à fait acceptables, de l'ordre de 100 % avec une croissance significativement plus rapide pour les plants ayant bénéficié d'un apport de top soil. Dans un second temps, des *T. guillainii* ont été plantés, malheureusement les plants étaient à un stade encore très juvénile et leur plantation est arrivé près d'un an et demi après la date initialement prévue, aussi bien qu'en décalant la fin de l'expérience au maximum du raisonnable, les plants ont été évalués après seulement 1 an. Cet espèce a subi un fort taux de mortalité pendant l'année qui a suivi la plantation. De cet essai, nous concluons : 1- les plants de *D. viscosa* et *A. spirorbis* se développent clairement mieux sur le sol amendé en topsoil comparé au stérile minier brut, 2- on constate après la plantation des *A. spirorbis* et des *T. guillainii*, une diversité réduite pour ces espèces, 3- on observe un transfert des taxons ectomycorhiziens entre la plante nurse *A. spirorbis* et la plante cible *T. guillainii* similaire selon la qualité du sol, 4- la diversité ectomycorhizienne n'est pas liée aux composants des sols, 5- les *Thelephoraceae* et les *Sclerodermataceae* sont les espèces ectomycorhiziennes dominantes des cortèges associées aux espèces plantées. Il ressort de cette expérience, qu'*A. spirorbis* a un potentiel à transférer ses communautés ectomycorhiziennes aux autres espèces plantées à proximité.

Ces travaux ont permis la préparation de quatre articles pour des revues scientifiques spécialisées, un article accepté pour publication dans la revue *Microbial Ecology*, un article en cours de relecture pour la revue *Mycorrhiza* et deux articles en préparation. Au-delà de ces publications, l'ensemble de ces observations et résultats nous permet de faire des propositions pour initier un processus de restauration écologique des maquis miniers sur sols ferralitique après leur destruction par l'activité minière. Dans un premier temps, les sols nus seront replantés avec de l'*A. spirorbis* avec un écartement entre les plants de 2 m sur 2 m, soit 2.601 plants à l'hectare. Après un temps variable de 3 à 6 ans, temps qui dépendra notamment de l'apport ou non de topsoil pour permettre au peuplement d'*A. spirorbis* à débiter la formation d'une litière, une première éclaircie sera réalisée. Cette éclaircie consistera à laisser un rang sur 3, en pratiquant le même niveau d'éclaircie en ligne et en colonne, ainsi la densité est réduite à 289 arbres à l'hectare. Les espaces libérés seront alors replantés pour partie avec des espèces à mycorhizes arbusculaires et non mycorhiziennes, si possible à proximité immédiate des *A. spirorbis* restant. Les rangs les plus distants seront replantés avec des espèces à ectomycorhizes, notamment, dans le cas du massif de Koniambo par des *Tristaniopsis* spp. Enfin, après avoir constaté la bonne reprise des plantations réalisées, une seconde éclaircie sera réalisée sur les *A. spirorbis* restant de sorte à ne laisser que 81 arbres à l'hectare avec un espacement de 12 m sur 12 m. La nécessité de replanter ces emplacements devra être appréciée en fonction du développement des plantations.

Enfin ces travaux laissent aussi sur le terrain deux essais à suivre et notamment un essai qui justement initie l'itinéraire technique que nous proposons de développer pour la restauration écologique des terrains miniers dégradés.



## Références bibliographiques

- Abarenkov, Kessy, Leho Tedersoo, R Henrik Nilsson, Kai Vellak, Irja Saar, and Vilmar Veldre, 'Evolutionary Bioinformatics PlutoF — a Web Based Workbench for Ecological and Taxonomic Research , with an Online Implementation for Fungal ITS Sequences', *Evolutionary Bioinformatics*, 6 (2010), 189–96 <<http://dx.doi.org/10.4137/EBO.S6271>>
- Aronson, J, Floret C, E Le Floc'H, C Ovalle, and R Pontanier, *Restauration et Réhabilitation Des Écosystèmes Dégradés En Zones Arides et Semi-Arides. Le Vocabulaire et Les concepts.Chapitre 2. L'homme Peut-Il Refaire Ce Qu'il a Défait?*, John Libbe (Paris, 1995)
- Aronson, James, Andre F Clewell, James N Blignaut, and Sue J Milton, 'Ecological Restoration : A New Frontier for Nature Conservation and Economics', 14 (2006) <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jnc.2006.05.005>>
- Badano, Ernesto Iván, Omar Ricardo Samour-Nieva, and Joel Flores, 'Emulating Nurse Plants to Restore Oak Forests', *Ecological Engineering*, 37 (2011), 1244–48 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoleng.2011.02.017>>
- Le Bagousse-Pinguet, Yoann, Pierre Liancourt, Nicolas Gross, and Dietmar Straile, 'Indirect Facilitation Promotes Macrophyte Survival and Growth in Freshwater Ecosystems Threatened by Eutrophication', *Journal of Ecology*, 100 (2012), 530–38 <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2745.2011.01931.x>>
- Bertness, Mark D., and Ragan Callaway, 'Positive Interactions in Communities', *Trends in Ecology and Evolution*, 9 (1994), 187–91 <[http://dx.doi.org/10.1016/0169-5347\(94\)90087-6](http://dx.doi.org/10.1016/0169-5347(94)90087-6)>
- Bonfante, Paola, and Andrea Genre, 'Mechanisms Underlying Beneficial Plant-Fungus Interactions in Mycorrhizal Symbiosis.', *Nature Communications*, 1 (2010), 48 <<http://dx.doi.org/10.1038/ncomms1046>>
- Bordez, L., P. Jourand, M. Ducousso, F. Carriconde, Y. Cavaloc, S. Santini, and others, 'Distribution Patterns of Microbial Communities in Ultramafic Landscape: A Metagenetic Approach Highlights

- the Strong Relationships between Diversity and Environmental Traits’, *Molecular Ecology*, 2016, 2258–72 <<http://dx.doi.org/10.1111/mec.13621>>
- Bordez, Laurent, ‘Stratégies de Re-Végétalisation Des Maquis Miniers Nickélifères de Nouvelle-Calédonie : Étude Sur Les Potentiels Biologiques Des Topsoils et Leur Gestion En Vue de Leur Utilisation Pour La Restauration Écologique Du Milieu Dégradé.’ (Université de la Nouvelle-Calédonie- École doctorale du Pacifique ED469, 2015)
- Bradford, Martin D, and Ernest Schwab, ‘Current Usage of Symbiosis and Associated Terminology’, *International Journal of Biology*, 5 (2013), 32–45 <<http://dx.doi.org/10.5539/ijb.v5n1p32>>
- Brooker, Rob W., Fernando T. Maestre, Ragan M. Callaway, Christopher L. Lortie, Lohengrin A. Cavieres, Georges Kunstler, and others, ‘Facilitation in Plant Communities: The Past, the Present, and the Future’, *Journal of Ecology*, 96 (2008), 18–34 <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2745.2007.01295.x>>
- Bruno, John F., John J. Stachowicz, and Mark D. Bertness, ‘Inclusion of Facilitation into Ecological Theory’, *Trends in Ecology and Evolution*, 18 (2003), 119–25 <[http://dx.doi.org/10.1016/S0169-5347\(02\)00045-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0169-5347(02)00045-9)>
- Callaway, Ragan M, ‘Positive Interactions among Plants’, *Botanical Review*, 61 (1995), 306–49
- Callaway, Ragan M, Lawrence R Walker, and No Oct, ‘Competition and Facilitation : A Synthetic Approach to Interactions in Plant Communities’, *Ecology*, 78 (1997), 1958–65
- Carriconde, Fabian, Monique Gardes, Patricia Jargeat, Jacob Heilmann-Clausen, Bello Mouhamadou, and Hervé Gryta, ‘Population Evidence of Cryptic Species and Geographical Structure in the Cosmopolitan Ectomycorrhizal Fungus, *Tricholoma Scalpturatum*’, *Microbial Ecology*, 56 (2008), 513–24 <<http://dx.doi.org/10.1007/s00248-008-9370-2>>
- Cázares, Efrén, James M Trappe, and Ari Jumpponen, ‘Mycorrhiza-Plant Colonization Patterns on a Subalpine Glacier Forefront as a Model System of Primary Succession’, 2005, 405–16 <<http://dx.doi.org/10.1007/s00572-004-0342-1>>

- Chaintreuil, Clémence, Frédéric Rigault, Lionel Moulin, Tanguy Jaffré, Joël Fardoux, Eric Giraud, and others, 'Nickel Resistance Determinants in Bradyrhizobium Strains from Nodules of the Endemic New Caledonia Legume *Serianthes Calycina*.', *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (2007), 8018–22 <<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01431-07>>
- Chao, Anne, Robin L. Chazdon, Robert K. Colwell, and Tsung-Jen Shen, 'A New Statistical Approach for Assessing Similarity of Species Composition with Incidence and Abundance Data', *Ecology Letters*, 8 (2005), 148–59 <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1461-0248.2004.00707.x>>
- Chao, Anne, Chun Huo Chiu, and Lou Jost, 'Statistical Challenges of Evaluating Diversity Patterns across Environmental Gradients in Mega-Diverse Communities', *Journal of Vegetation Science*, 27 (2016), 437–38 <<http://dx.doi.org/10.1111/jvs.12420>>
- Cherrier, J-F, 'Reverdissement Des Terrains Miniers En Nouvelle Calédonie', *Bois et Forêts Des Tropiques*, 225 (1990), 5–23
- Choler, Philippe, Richard Michalet, and Ragan M Callaway, 'Facilitation and Competition on Gradients in Alpine Plant Communities', *Ecology*, 82 (2001), 3295–3308 <[http://dx.doi.org/10.1890/0012-9658\(2001\)082\[3295:FACOGI\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1890/0012-9658(2001)082[3295:FACOGI]2.0.CO;2)>
- Chopra, K, R Leemans, P Kumar, and H Simons, *Ecosystems and Human Well-Being: Policy Responses. The Millennium Ecosystem Assessment Series Vol. 3*, Island Pre (Washington, 20058)
- Cornu Alain, Sarrailh Jean-Michel, Marion France, Langrand Olivier, Ndinga Assitou. 2001 Espèces endémiques et restauration écologique en Nouvelle-Calédonie. . *Bois et Forêts des Tropiques* (268) : 57-68.-
- Doyle, Jeff J, and Melissa A Luckow, 'The Rest of the Iceberg . Legume Diversity and Evolution in a Phylogenetic Context 1', *Plant Physiology*, 131 (2003), 900–910 <<http://dx.doi.org/10.1104/pp.102.018150.groups>>
- Ducousso, Marc, and Amid Hamir, 'Les Bactéries et Les Champignons Du Sol Sur Roches Ultramafiques.', in *Mines et Environnement de Nouvelle-Calédonie*, IAC, 2010, pp. 129–44

- Ducousso, Marc, Sylvie Proust, and Agathe Kpenou, 'Premier Inventaire Des Champignons (Macromycètes) de Quatre Forêts Sèches de Nouvelle-Calédonie. Rapport n°07/2010' (Nouméa: SMNC, 2010), p. 24
- Ducousso, Marc, Sylvie Proust, Denis Vigier, and Guillaume Eyssartier, 'Podoserpula Miranda', *Bois et Forêts Des Tropiques.*, 302 (2009), 73–75
- Ducousso, Marc, Heriniaina Ramanankierana, Robin Duponnois, Raymond Rabévoitra, Laurent Randrihasipara, Manon Vincelette, and others, 'Mycorrhizal Status of Native Trees and Shrubs from Eastern Madagascar Littoral Forests with Special Emphasis on One New Ectomycorrhizal Endemic Family, the Asteropeiaceae.', *The New Phytologist*, 178 (2008), 233–38 <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02389.x>>
- Duponnois, R, Y Prin, E Baudoin, A Galiana, and B Dreyfus, 'Les Champignons Mycorhiziens : Une Composante Majeure Dans Les Processus Biologiques Régissant La Stabilité et La Productivité Des Écosystèmes Forestiers Tropicaux', in *Le Projet Majeur Africain de La Grande Muraille Verte*, IRD. Labor, 2007, pp. 421–40
- Duponnois, Robin, Christian Plenchette, and Amadou M. Bâ, 'Growth Stimulation of Seventeen Fallow Leguminous Plants Inoculated with *Glomus Aggregatum* in Senegal', *European Journal of Soil Biology*, 37 (2001), 181–86 <[http://dx.doi.org/10.1016/S1164-5563\(01\)01077-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1164-5563(01)01077-9)>
- Duponnois, Robin, Heriniaina Ramanankierana, Mohamed Hafidi, Rondro Baohanta, Ezékiel Baudoin, Amadou Bâ, and others, 'Des Ressources Végétales Endémiques Pour Optimiser Durablement Les Opérations de Réhabilitation Du Couvert Forestier En Milieu Méditerranéen et Tropical : Exemple Des Plantes Facilitatrices Vectrices de Propagation Des Champignons Mycorhiziens', in *Panafrican Colloquium Daka 2012*, 2013, pp. 265–72
- Eriksson, O, and J Ehrlén, 'Landscape Fragmentation and the Viability of Plant Populations.', in *Integrating Ecology and Evolution in a Spatial Context.*, 2001, pp. 157–75
- Eyssartier, Guillaume, Marc Ducousso, and Bart Buyck, 'Agaricales Nouveaux Ou Intéressants de

- Nouvelle-’, *Cryptogamie Mycologie*, 30 (2008), 329–39
- Finlay, R.D, and D.J. Read, ‘J. READ Botany Department, University of Sheffield, Sheffield, SIO 2TN {Accepted 23 December 1985}’, *New Phytologist*, 103 (1986), 157–65
- Franche, Claudine, Kristina Lindström, and Claudine Elmerich, ‘Nitrogen-Fixing Bacteria Associated with Leguminous and Non-Leguminous Plants’, *Plant and Soil*, 321 (2009), 35–59  
<<http://dx.doi.org/10.1007/s11104-008-9833-8>>
- Fritsch, Emmanuel, ‘Les Sols’, in *Atlas de La Nouvelle-Calédonie*, Institut d, 2012, p. 15
- Galiana, Antoine, Jean-Pierre Bouillet, and Francis Ganry, ‘The Importance of Biological Nitrogen Fixation by Trees in Agroforestry. Symbiotic Nitrogen Fixation. Prospect for Enhanced Application in Tropical Agriculture.’, *Science Publishers*, 2004, 185–99
- Garbaye, Jean, *La Symbiose Mycorrhizienne : Une Association Entre Les Plantes et Les Champignons*, Quae, 2013
- Gardes, M., and T.D. Bruns, ‘ITS Primers with Enhanced Specificity for Basidiomycetes, Application to the Identification of Mycorrhiza and Rusts’, *Molecular Ecology*, 2 (1993), 113–18  
<<http://dx.doi.org/Doi 10.1111/J.1365-294x.1993.Tb00005.X>>
- Grangeteau C, ‘Diversity of Nitrogen Fixing Bacteria Associated to the New Caledonian Ubiquitous Tree *Acacia Spirorbis*’, in *European Geoscience Union, General Assembly* (vienna, 2012)
- Hartmann, Martin, Charles G Howes, David Vaninsberghe, Hang Yu, Dipankar Bachar, Richard Christen, and others, ‘Significant and Persistent Impact of Timber Harvesting on Soil Microbial Communities in Northern Coniferous Forests’, *The ISME Journal*, 6 (2012), 2199–2218  
<<http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2012.84>>
- Henry, Charline, ‘Stimuler Les Communautés Mycorrhiziennes Par Des Plantes Nurses Pour La Restauration Écologique: Exemple D’une Forêt Tropicale Malgache Après Exploitation Minière’ (AgroParisTech, 2015)
- Henry, Charline, Jeanne-Françoise Raivoarisoa, Angélo Razafimamonjy, Heriniaina Ramanankierana,

Paul Andrianaivomahefa, Marc Ducousso, and others, 'Transfer to Forest Nurseries Significantly Affects Mycorrhizal Community Composition of *Asteropeia Mcphersonii* Wildings', *Mycorrhiza*, 2016 <<http://dx.doi.org/10.1007/s00572-016-0750-z>>

Henry, Charline, Jeanne Francoise Raivoarisoa, Angelo Razafimamonjy, Heriniaina Ramanankierana, Paul Andrianaivomahefa, Marc Andre Selosse, and others, 'Asteropeia Mcphersonii, a Potential Mycorrhizal Facilitator for Ecological Restoration in Madagascar Wet Tropical Rainforests', *Forest Ecology and Management*, 358 (2015), 202–11 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foreco.2015.09.017>>

Herrera, Aude, Marina Héry, James E M Stach, Tanguy Jaffré, Philippe Normand, and Elisabeth Navarro, 'Species Richness and Phylogenetic Diversity Comparisons of Soil Microbial Communities Affected by Nickel-Mining and Revegetation Efforts in New Caledonia', *European Journal of Soil Biology*, 43 (2007), 130–39 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejsobi.2006.12.001>>

Héry, Marina, Laurent Philippot, Eve Mériaux, Franck Poly, Xavier Le Roux, and Elisabeth Navarro, 'Nickel Mine Spoils Revegetation Attempts: Effect of Pioneer Plants on Two Functional Bacterial Communities Involved in the N-Cycle', *Environmental Microbiology*, 7 (2005), 486–98 <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00705.x>>

Hilszczanska, Dorota, and Sierota Zbigniew, 'Persistence of Ectomycorrhizas by *Thelephora Terrestris* on Outplanted Scots Pine Seedlings', *Acta Mycologica*, 41 (2006), 313–18

Holmgren, Milena, and Marten Scheffer, 'Strong Facilitation in Mild Environments: The Stress Gradient Hypothesis Revisited', *Journal of Ecology*, 98 (2010), 1269–75 <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2745.2010.01709.x>>

Honnay, Olivier, and Hans Jacquemyn, 'Susceptibility of Common and Rare Plant Species to the Genetic Consequences of Habitat Fragmentation', *Conservation Biology*, 21 (2007), 823–31 <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1523-1739.2006.00646.x>>

Hortal, S., F. Bastida, C. Armas, Y.M. Lozano, J.L. Moreno, C. García, and others, 'Soil Microbial

- Community under a Nurse-Plant Species Changes in Composition, Biomass and Activity as the Nurse Grows', *Soil Biology and Biochemistry*, 64 (2013), 139–46  
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.04.018>>
- Horton, T.R., T.D. Bruns, and V.T. Parker, 'Ectomycorrhizal Fungi Associated with *Arctostaphylos* Contribute to *Pseudotsuga Menziesii* Establishment', *Canadian Journal of Botany*, 77 (1999), 93–102 <<http://dx.doi.org/10.1139/cjb-77-1-93>>
- Hsieh, T. C., K. H. Ma, and Anne Chao, 'iNEXT: An R Package for Rarefaction and Extrapolation of Species Diversity (Hill Numbers)', *Methods in Ecology and Evolution*, 2016  
<<http://dx.doi.org/10.1111/2041-210X.12613>>
- Ihrmark, Katarina, Inga T M Bødeker, Karelyn Cruz-Martinez, Hanna Friberg, Ariana Kubartova, Jessica Schenck, and others, 'New Primers to Amplify the Fungal ITS2 Region - Evaluation by 454-Sequencing of Artificial and Natural Communities', *FEMS Microbiology Ecology*, 82 (2012), 666–77 <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01437.x>>
- Isnard, Sandrine, Laurent L'huillier, Frédéric Rigault, and Tanguy Jaffré, 'How Did the Ultramafic Soils Shape the Flora of the New Caledonian Hotspot?', *Plant and Soil*, 403 (2016), 53–76  
<<http://dx.doi.org/10.1007/s11104-016-2910-5>>
- Jaffré, Tanguy, 'La Végétation et La Flore D'un Massif de Roches Ultrabasiques de Nouvelle-Calédonie: Le Koniambo', *Candollea*, 29 (1974), 427–56
- Jaffré, Tanguy, and Laurent L'huillier, 'La Végétation Des Roches Ultramafiques Ou Terrains Miniers', in *Mines et Environnement En Nouvelle-Calédonie*, IAC, 2010, pp. 45–103
- Jaffré, Tanguy, and B. Pelletier, *Plantes de Nouvelle-Calédonie Permettant de Revégétaliser Des Sites Miniers*, 1992
- Jaffré, Tanguy, and Frédéric Rigault, *Recherches Sur Les Possibilités D'implantation Végétale Sur Sites Miniers (Rapport Final)*, 1991
- Jaffré, Tanguy, Frédéric Rigaults, and JM Sarrailh, 'Des Anciens Sites Miniers', *Bois et Forêts Des*

*Tropiques*, 1994

Jaffré Tanguy, Latham Marc, *Recherches Sur Les Possibilités D'implantation Végétale Sur Déblais Miniers : Rapport Final*, ORSTOM, 1976

Jakucs, Erzsébet, and Zsolt Er, 'Morphological-Anatomical Characterization and Identification of Tomentella Ectomycorrhizas', *Mycorrhiza*, 2008, 277–85 <<http://dx.doi.org/10.1007/s00572-008-0183-4>>

Jourand, Philippe, Marc Ducouso, Robert Reid, Clarisse Majorel, Clément Richert, Jennifer Riss, and others, 'Nickel-Tolerant Ectomycorrhizal Pisolithus Albus Ultramafic Ecotype Isolated from Nickel Mines in New Caledonia Strongly Enhance Growth of the Host Plant Eucalyptus Globulus at Toxic Nickel Concentrations.', *Tree Physiology*, 30 (2010), 1311–19 <<http://dx.doi.org/10.1093/treephys/tpq070>>

Jourand, Philippe, Laure Hannibal, Clarisse Majorel, Stéphane Mengant, Marc Ducouso, and Michel Lebrun, 'Ectomycorrhizal Pisolithus Albus Inoculation of *Acacia Spirorbis* and Eucalyptus Globulus Grown in Ultramafic Topsoil Enhances Plant Growth and Mineral Nutrition While Limits Metal Uptake', *Journal of Plant Physiology*, 171 (2014), 164–72 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2013.10.011>>

Jumpponen, A., P. Högberg, K. Huss-Danell, and C. P. H. Mulder, 'Interspecific and Spatial Differences in Nitrogen Uptake in Monocultures and Two-Species Mixtures in North European Grasslands', *Functional Ecology* 2002, 16 (2002), 454–61

Kawai, Takashi, and Mutsunori Tokeshi, 'Testing the Facilitation-Competition Paradigm under the Stress-Gradient Hypothesis: Decoupling Multiple Stress Factors.', *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 274 (2007), 2503–8 <<http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2007.0871>>

Kazakou, E, P G Dimitrakopoulos, A J M Baker, R D Reeves, and A Y Troumbis, 'Hypotheses , Mechanisms and Trade-Offs of Tolerance and Adaptation to Serpentine Soils : From Species to Ecosystem Level', *Biological Reviews*, 83 (2008), 495–508 <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469->



185X.2008.00051.x>

Kettle, C. J., P. M. Hollingsworth, T. Jaffré, B. Moran, and R. A. Ennos, 'Identifying the Early Genetic Consequences of Habitat Degradation in a Highly Threatened Tropical Conifer, *Araucaria Nemoiosa* Laubenfels', *Molecular Ecology*, 16 (2007), 3581–91 <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03419.x>>

Koch, J. M., S. C. Ward, C. D. Grant, and G. L. Ainsworth, 'Effects of Bauxite Mine Restoration Operations on Topsoil Seed Reserves in the Jarrah Forest of Western Australia', *Society for Ecological Restoration*, 4 (1996), 368–76 <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1526-100X.1996.tb00189.x>>

L'Huillier, Laurent, Adrien Wulff, Gildas Gâteblé, Bruno Fogliani, Charly Zongo, and Tanguy Jaffré, 'La Restauration Des Sites Miniers', in *Mines et Environnement de Nouvelle-Calédonie*, IRD, 2010, pp. 147–230

Lagrange, Alexandre, 'Etudes Ecologique et Microbiologique Des Espèces Du Genre *Costularia* (Cyperaceae) Pionnières Des Sols Ultramaïques de Nouvelle-Calédonie : Applications à La Restauration Ecologique' (Université de Nouvelle-Calédonie, 2010)

Latham, M., P. Quantin, and G. Aubert, *Étude Des Sols de La Nouvelle-Calédonie. Nouvel Essai Sur La Classification, La Caractérisation, La Pédogenèse et Les Aptitudes Des Sols de Nouvelle-Calédonie. Notice Explicative n°78*, ORSTOM (Paris, 1978)

Lazaruk, Lance W., Gavin Kernaghan, S. Ellen Macdonald, and Damase Khasa, 'Effects of Partial Cutting on the Ectomycorrhizae of *Picea glauca* Forests in Northwestern Alberta', *Canadian Journal of Forestry Restoration*, 35 (2005), 1442–54 <<http://dx.doi.org/10.1139/X05-062>>

Li, Weizhong, and Adam Godzik, 'Cd-Hit: A Fast Program for Clustering and Comparing Large Sets of Protein or Nucleotide Sequences', *Bioinformatics*, 22 (2006), 1658–59 <<http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btl158>>

Maestre, Fernando T., Ragan M. Callaway, Fernando Valladares, and Christopher J. Lortie, 'Refining

- the Stress-Gradient Hypothesis for Competition and Facilitation in Plant Communities’, *Journal of Ecology*, 97 (2009), 199–205 <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2745.2008.01476.x>>
- Martin, M. (2010). Cutadapt Removes Adapter Sequences From High-Throughput Sequencing Reads. *EMBnet.journal* 17, 10–12.
- Maurizot, P, and M Vendé-Leclerc, ‘La Géomorphie’, in *Atlas de La Nouvelle-Calédonie*, Institut d, 2012, p. 14
- Morat, Philippe, Tanguy Jaffré, Frédéric Tronchet, Jérôme Munzinger, Yohan Pillon, Jean-marie Veillon, and others, ‘Le Référentiel Taxonomique Florical et Les Caractéristiques de La Flore Vasculaire Indigène de La Nouvelle-Calédonie.’, *BioOne*, 34 (2012), 179–221 <<http://dx.doi.org/10.5252/a2012n2a1>>
- Myers, N, R a Mittermeier, C G Mittermeier, G a da Fonseca, and J Kent, ‘Biodiversity Hotspots for Conservation Priorities.’, *Nature*, 403 (2000), 853–58 <<http://dx.doi.org/10.1038/35002501>>
- Oostermeijer, J G B, S H Luijten, and J C M Den Nijs, ‘Integrating Demographic and Genetic Approaches in Plant Conservation’, *Biological Conservation*, 113 (2003), 389–98 <[http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3207\(03\)00127-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3207(03)00127-7)>
- Ortega-Larrocea, María Del Pilar, Beatriz Xoconostle-Cázares, Ignacio E Maldonado-Mendoza, Rogelio Carrillo-González, Jani Hernández-Hernández, Margarita Díaz Garduño, and others, ‘Plant and Fungal Biodiversity from Metal Mine Wastes under Remediation at Zimapan, Hidalgo, Mexico.’, *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 158 (2010), 1922–31 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2009.10.034>>
- Padilla, Francisco M., and Francisco I. Pugnaire, ‘The Role of Nurse Plants in the Restoration of Degraded Environments’, *Frontiers in Ecology and the Environment*, 4 (2006), 196–202 <[http://dx.doi.org/10.1890/1540-9295\(2006\)004\[0196:TRONPI\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1890/1540-9295(2006)004[0196:TRONPI]2.0.CO;2)>
- Peay, Kabir G., Max G. Schubert, Nhu H. Nguyen, and Thomas D. Bruns, ‘Measuring Ectomycorrhizal

- Fungal Dispersal: Macroecological Patterns Driven by Microscopic Propagules', *Molecular Ecology*, 21 (2012), 4122–36 <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05666.x>>
- Pedley, L., 'Leguminosae *Acacia Spirorbis* Labill. Subsp. Solandri (Benth.)', *Austrobaileya*, 3 (1990), 216
- Peintner, Ursula, and Frank Dämmrich, 'Tomentella Alpina and Other Tomentelloid Taxa Fruiting in a Glacier Valley', 2012, 109–19 <<http://dx.doi.org/10.1007/s11557-010-0734-x>>
- Pelletier, B, and M Esterle, 'Revegetation of Nickel Mines in New Caledonia', in *Quelle Recherche Française En Environnement Dans Le Pacifique Sud? Bilan et Perspectives*, 1995, p. 9 <<http://dx.doi.org/http://dx.doi.org/10.14806/ej.17.1.200>>
- Perrier, Nicolas, J. P. Ambrosi, F. Colin, and R. J. Gilkes, 'Biogeochemistry of a Regolith: The New Caledonian Koniambo Ultramafic Massif', *Journal of Geochemical Exploration*, 88 (2006), 54–58 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.gexplo.2005.08.015>>
- Reddell, P, and R Warren, 'Inoculation of Acacia with Mycorrhizal Fungi: Potential Benefits', in *ACIAR Proceedings* (Camberra, Australia, 1987), pp. 50–53
- Remy, Winfried, Thomas N. Taylor, Hagen Hass, and Hans Kerp, 'Four Hundred-Million-Year-Old Vesicular Arbuscular Mycorrhizae', *Plant Biology*., 91 (1994), 11841–43
- Ren, Hai, Long Yang, and Nan Liu, 'Nurse Plant Theory and Its Application in Ecological Restoration in Lower Subtropics of China', *Progress in Natural Science*, 18 (2008), 137–42 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pnsc.2007.07.008>>
- Richard, Franck, M. A. Selosse, and Monique Gardes, 'Facilitated Establishment of *Quercus Ilex* in Shrub-Dominated Communities within a Mediterranean Ecosystem: Do Mycorrhizal Partners Matter?', *FEMS Microbiology Ecology*, 68 (2009), 14–24 <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00646.x>>
- Rosenblueth, Monica, and Esperanza Martinez-Romero, 'Bacterial Endophytes and Their Interactions with Hosts', *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19 (2006), 827–37

<<http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-19-0827>>

Selosse, Marc-André, Ezékiel Baudoin, and Philippe Vandenkoornhuyse, 'Symbiotic Microorganisms , a Key for Ecological Success and Protection of Plants', *C.R. Biologies*, 327 (2004), 639–48  
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.crv.2003.12.008>>

Selosse, Marc Andre, 'Introduire Des Souches Ectomycorhiziennes Exotiques : Faits et Conséquences Potentielles', *Revue Forestiere Francaise*, 1997, 185–97

Selosse, Marc André, Franck Richard, Xinhua He, and Suzanne W. Simard, 'Mycorrhizal Networks : Des Liaisons Dangereuses ?', *TRENDS in Ecology and Evolution*, 21 (2006), 621–28  
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2006.07.003>>

Severoglu, Z, S Sumer, B Yalcin, Z Leblebici, and A Aksoy, 'Trace Metal Levels in Edible Wild Fungi', *International Journal of Environmental Science and Technology*, 10 (2013), 295–304  
<<http://dx.doi.org/10.1007/s13762-012-0139-2>>

Simard, Suzanne W, Kevin J Beiler, Marcus A Bingham, Julie R Deslippe, Leanne J. Philip, and François P. Teste, 'Mycorrhizal Networks : Mechanisms , Ecology and Modelling', *British Mycological Society*, 26 (2012), 39–60 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fbr.2012.01.001>>

Smith, Matthew E., Greg W. Douhan, and David M. Rizzo, 'Ectomycorrhizal Community Structure in a Xeric Quercus Woodland Based on rDNA Sequence Analysis of Sporocarps and Pooled Roots', *New Phytologist*, 174 (2007), 847–63 <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02040.x>>

Smith, Matthew E., Terry W. Henkel, Jessie K. Uehling, Alexander K. Fremier, H. David Clarke, and Rytas Vilgalys, 'The Ectomycorrhizal Fungal Community in a Neotropical Forest Dominated by the Endemic Dipterocarp Pakaraimaea Dipterocarpacea', *PLoS ONE*, 8 (2013), 1–13  
<<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0055160>>

Smith, Matthew E., and D. Read, *Mycorrhizal Symbiosis, 3rd Edition.*, Academic P (London, 2008)

Stachowicz, John J, 'Mutualism, Facilitation, and the Structure of Ecological Communities', *BioScience*, 51 (2001), 235–46

- Szaniszlo, Author P J, P E Powell, C P P Reid, G R Cline, Stable Url, P J Szaniszlo, and others, 'Production of Hydroxamate Siderophore Iron Chelators by Ectomycorrhizal Fungi', *Mycologia*, 73 (1981), 1158–74 <<http://dx.doi.org/10.2307/3759685>>
- Tansley, A. G., 'The Use and Abuse of Vegetational Concepts and Terms', *Ecological Society of America*, 16 (1935), 284–307
- Tedersoo, Leho, Mohammad Bahram, Sergei Põlme, Urmas Kõljalg, Nourou S Yorou, Ravi Wijesundera, and others, 'Global Diversity and Geography of Soil Fungi', *Science (New York, N.Y.)*, 346 (2014), 1052–53 <<http://dx.doi.org/10.1126/science.1256688>>
- Tedersoo, Leho, Tom W. May, and Matthew E. Smith, 'Ectomycorrhizal Lifestyle in Fungi: Global Diversity, Distribution, and Evolution of Phylogenetic Lineages', *Mycorrhiza*, 20 (2010), 217–63 <<http://dx.doi.org/10.1007/s00572-009-0274-x>>
- Wali, Mohan K, 'Ecological Succession and the Rehabilitation of Disturbed Terrestrial Ecosystems', *Plant and Soil*, 213 (1999), 195–220
- Wang, B., and Y. L. Qiu, 'Phylogenetic Distribution and Evolution of Mycorrhizas in Land Plants', *Mycorrhiza*, 16 (2006), 299–363 <<http://dx.doi.org/10.1007/s00572-005-0033-6>>
- Wardle, D. a., and Björn D. Lindahl, 'Disentangling Global Soil Fungal Diversity', *Science (New York, N.Y.)*, 346 (2014), 1052–53 <<http://dx.doi.org/10.1126/science.aaa1185>>
- Waseem, Muhammad, 'Biodiversité et Stratégies Adaptatives Des Bactéries Mycorrhizosphériques Associées À Tristaniopsis Dans Les Écosystèmes Ultramaïques de Nouvelle-Calédonie.', 2011
- Waseem, Muhammad, Marc Ducousso, Yves Prin, Odile Domergue, Laure Hannibal, Clarisse Majorel, and others, 'Ectomycorrhizal Fungal Diversity Associated with Endemic Tristaniopsis Spp. (Myrtaceae) in Ultramafic and Volcano-Sedimentary Soils in New Caledonia', *Mycorrhiza*, 2017 <<http://dx.doi.org/10.1007/s00572-017-0761-4>>
- Weil, Ray R., and Nyle C Brady, *The Nature and Properties of Soils*, ed. by Daryl Fox, Fifteenth, 2016
- White, T.J., T. Bruns, S. Lee, and J.W. Taylor, 'Amplification and Direct Sequencing of Fungal

Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics.’, in *PCR Proto- Cols: A Guide to Methods and Applications*, ed. by M.A. Innis and others, Academic P (New York, 1990), LXIV, 315–22

Whiting, S N, R D Reeves, D Richards, M S Johnson, J A Cooke, F Malaisse, and others, ‘Research Priorities for Conservation of Metallophyte Biodiversity and Its Sustainable Uses in Ecological Restoration and Site Remediation’, *Restoration Ecology*, 12 (2004), 106–16

Yang, Long, Nan Liu, Hai Ren, and Jun Wang, ‘Facilitation by Two Exotic Acacia: *Acacia Auriculiformis* and *Acacia Mangium* as Nurse Plants in South China’, *Forest Ecology and Management*, 257 (2009), 1786–93 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foreco.2009.01.033>>



## Résumé

*Acacia spirorbis* est une espèce endémique de la Nouvelle-Calédonie, capable de former des symbioses avec des microorganismes du sol, notamment des ectomycorhizes et de se développer sur une très large variété de sols. Afin de tester les capacités de cette espèce à permettre d'initier un processus de restauration écologique des écosystèmes dégradés par l'exploitation minière, un essai en pépinière et trois essais sur le terrain ont été mis en place. Ces essais ont permis de mettre en évidence la capacité d'*A. spirorbis* à jouer, grâce à la facilitation, un rôle de plante nurse pour des espèces cibles de la restauration écologique comme des espèces du genre *Tristaniopsis*. Ainsi, nous avons tout d'abord décrit la diversité des champignons ectomycorhiziens associés avec *A. spirorbis* puis, nous avons constatés leur capacité à s'associer sur le terrain aux *Tristaniopsis* grâce à la présence initiale d'*A. spirorbis*. Les capacités d'*A. spirorbis* à faciliter l'implantation d'autres espèces en améliorant leur survie, leur croissance et en leur permettant de disposer de partenaires fongiques ectomycorhiziens diversifiés sont décrites. Ces résultats ont conduit à proposer un itinéraire technique de restauration écologique des maquis miniers dégradés, itinéraire fondés sur la facilitation entre espèce utilisant *A. spirorbis* comme plante nurse.

**Mots clefs:** Maquis minier, Restauration écologique, *Acacia spirorbis*, Plante nurse, Nouvelle-Calédonie, ectomycorrhize

## Abstract

*Acacia spirorbis* is an endemic species of New Caledonia, capable of forming symbiosis with soil microorganisms, including ectomycorrhizae and developing on a very wide variety of soils. In order to test the capacities of this species to initiate a process of ecological restoration of ecosystems degraded by mining activities, a nursery trial and three field trials were set up. These trials highlight the ability of *A. spirorbis* to play, through facilitation, a nurse plant role for target species of the genus *Tristaniopsis* in the frame of ecological restoration processes. Thus, we first described the diversity of the ectomycorrhizal fungi associated with *A. spirorbis* and then we described their ability to associate in the field with *Tristaniopsis* thanks to the initial presence of *A. spirorbis*. The capacities of *A. spirorbis* to facilitate the implantation of other target species by improving their survival, growth and allowing them to access to a diversified range of ectomycorrhizal fungal partners are described. These results led to propose a technical itinerary for ecological restoration of degraded mining maquis, an itinerary based on facilitation between species using *A. spirorbis* as a nurse plant.

**Keywords:** Maquis minier, Ecological Restoration, *Acacia spirorbis*, Nurse plant, New Caledonia